

CRISTIANE BIGATTI PEREIRA

TESE DE DOUTORADO

**Bioprospecção e caracterização de substâncias antifúngicas
capazes de inibir espécies patogênicas de *Cryptococcus* a partir
dos extratos de fungos endofíticos associados a plantas endêmicas
de diferentes ecossistemas brasileiros**

UFMG

2013

CRISTIANE BIGATTI PEREIRA

Bioprospecção e caracterização de substâncias antifúngicas capazes de inibir espécies patogênicas de *Cryptococcus* a partir dos extratos de fungos endofíticos associados a plantas endêmicas de diferentes ecossistemas brasileiros

Tese apresentada no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Microbiologia.

Orientadora: Dr.a Susana Johann

Co-orientadores: Dr.a Betania Barros Cota

Dr. Carlos A. Rosa

Colaboradores:

Dr. Luiz Henrique Rosa

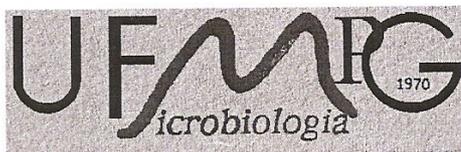
Dr. Carlos Leomar Zani

Dr.a Tânia M. A. Alves

Msc. Alice F. S Hughes

Belo Horizonte, MG

2013



**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia**

ALUNA: CRISTIANE BIGATTI PEREIRA

Nº matrícula: 2009750416

Programa de Pós-graduação em Microbiologia - NÍVEL DOUTORADO

Defesa de Tese: 11 de outubro de 2013

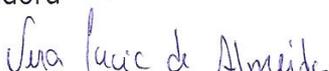
Título: "Bioprospecção e caracterização de substâncias antifúngicas capazes de inibir espécies patogênicas de *Cryptococcus* a partir dos extratos de fungos endofíticos associados a plantas endêmicas de diferentes ecossistemas brasileiros"

Suplente externo: Prof. Rachel Basques Caligiorne

A Tese foi submetida à apreciação do Prof. Luiz Henrique Rosa que emitiu parecer favorável.


Prof. Jovita Eugênia Gazzinelli Cruz Madeira
Examinadora

Aprovada: *sim*


Prof. Dr. Vera Lúcia de Almeida
Examinador

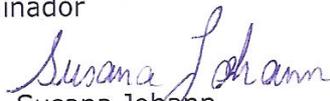
Aprovada: *sim.*


Prof. Fernão Castro Braga
Examinador

Aprovada: *sim,*


Prof. Daniel de Assis Santos
Examinador

Aprovada: *sim*


Prof. Susana Johann
Orientadora

Aprovada: *sim*


Prof. Flávio Guimarães da Fonseca
Subcoordenador

Dedico este trabalho a Deus que muito me ajudou e sustentou;

Aos meus Amados Pais Raulino e Lúcia,

ao meu irmão Marlúcio, esposa Simone e

em especial ao meu sobrinho Gabriel, seu nascimento foi a maior

manifestação do poder e misericórdia do Altíssimo e

trouxe novo ânimo e muitas alegrias.

Obrigada pela confiança e apoio que foram fundamentais

na realização deste curso e concretização deste sonho.

Amo vocês!

Essa vitória e conquista é nossa!

AGRADECIMENTOS

“Porque nEle foram criadas todas as coisas que há nos céus e na terra, visíveis e **invisíveis**...
... tudo foi criado por Ele e para Ele” (Colossenses 1:16).

Agradeço a ti Senhor por que: “tu és o meu Deus; exaltar-te-ei a ti, e louvarei o teu nome porque fizestes maravilhas; os teus conselhos antigos são verdade e firmeza” (Isaías 25:1).

Muito obrigada, Senhor, pelo amor incondicional, cuidado e misericórdias que sempre se renovam sobre mim e me fizeram alcançar mais esta bênção!

À Susana pela coragem de aceitar a orientação já em andamento. Essa conquista não seria possível sem sua preciosa e importante participação, obrigada por tudo! Você é um exemplo de dedicação e perseverança na busca do sonho!

À Betânia, querida co-orientadora, você mostrou que apesar das dificuldades é preciso continuar trabalhando e acreditando que no fim tudo dá certo. Obrigada pela imensa paciência, atenção e indiscutível ajuda na realização deste trabalho que foram indispensáveis para que conseguisse essa vitória que também é sua!

Ao Carlos Rosa que inicialmente aceitou a orientação e abriu as portas do laboratório. Serei sempre grata pela oportunidade e pelo exemplo de honestidade, trabalho e dedicação à pesquisa;

À Querida amiga Maurette que mesmo distante sempre me apoiou e mais uma vez mostrou que não há limite para alcançar um objetivo, sua amizade é um bem precioso que nenhuma distância poderá destruir ou abalar!

Aos colaboradores desta tese, Dr.a Tânia Maria de Almeida Alves e Dr. Carlos Leomar Zani, por disponibilizarem a infra-estrutura do Laboratório de Química de Produtos Naturais do Centro de Pesquisas René Rachou.; e ao Dr. Luiz H. Rosa que sempre mostrou-se à disposição quando sua ajuda foi solicitada;

Aos Queridos irmãos em Cristo que muito oraram por mim, em especial aos irmãos da Igreja Cristã Maranata do bairro Planalto, em especial à Aila, Ana Paula, Heitor, Fátima, Lucas e Alessandra;

Aos membros da banca examinadora, por ter aceitado o convite e pelas contribuições que certamente enriquecerão o trabalho e o artigo;

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia pela oportunidade; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro;

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, especialmente ao Douglas, à Fatinha e à Patrícia;

Aos amigos (antigos e recentes) do Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos, em especial agradeço:

À Mariana Vieira (que me recebeu carinhosamente no laboratório). À Vívian, Camila Rodrigues, Mariana Costa, Fernanda Piló, Natália, Camila Gontijo, Aline Vaz, Bárbara, Michelle, Ísis, Raquel Cadete, Renata, Iara, Mariana Rocha, Camila Silva, Isabel, Bia Borelli. Obrigada pelo carinho e bons momentos vividos. Desejo a vocês todo sucesso e felicidade!

Um agradecimento especial à Alice Hughes (Alição!) pela amizade e preciosa contribuição na etapa de identificação do fungo ativo, sem você essa parte do trabalho não seria realizada. Obrigada pela sua alegria que sempre me fazia sorrir! Sempre vou lembrar-me dos cutucões e da implicância gratuita que sempre acabava em risadas (ôxe!). Muita felicidade e sucesso pra você e o Fred!

Aos queridos amigos do Laboratório de Química de Produtos Naturais, em especial a Dani Nabak, Fernanda, Carine, Ezequias, Carol Paula, Marcinha (doce e meiga Marcinha), Fábio (Coca-Cola), dona Belinha e a Priscila que me proporcionaram crescimento pessoal, e muitos momentos de boas risadas nas longas horas de trabalho para isolamento das substâncias.

À Eliane Carvalho do Laboratório de RMN da Plataforma de Métodos Analíticos da Farmanguinhos FIOCRUZ-RJ, obrigada pelos ensaios de RMN e carinho com que me recebeu no Rio.

À Marcella e Amanda do Espaço Forma que me acompanharam e ajudaram a cuidar da minha saúde. Obrigada pela paciência e pelo trabalho sério e dedicado que vocês desenvolveram comigo.

Em especial meu último agradecimento ao Marcus Vinícius Souza Dias, querido Marquim, você foi um presente que Deus mandou pra mim! Sei que nossa amizade é sincera e verdadeira! Espero que dure para sempre! Obrigada por me ouvir e aturar nos momentos de maior estresse. Muitíssimo obrigado pelas correções do Inglês e sugestões na escrita do trabalho. Com certeza você vai longe nas suas pesquisas e sei que ainda terei orgulho em dizer que te conheci e sou sua amiga.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	JUSTIFICATIVA	24
3	REVISÃO DE LITERATURA	25
3.1	<i>Cryptococcus</i> spp.	25
3.2	Características morfológicas e classificação das leveduras	26
3.3	<i>Cryptococcus</i> de importância clínica e origem da infecção	28
3.4	Criptococose	30
3.5	Epidemiologia	31
3.6	Tratamentos	34
3.7	Resistência e/ou tolerância aos antifúngicos por <i>Cryptococcus</i> spp.	38
3.7.1	Resistência aos antifúngicos por <i>C. neoformans</i>	39
3.7.2	Resistência aos antifúngicos por <i>C.gattii</i>	41
3.8	Importância dos micro-organismos endofíticos	41
3.9	Fungos endofíticos e bioprospecção de substâncias	43
4	OBJETIVOS	56
4.1	Geral	56
4.2	Objetivos Específicos	56
5	MATERIAIS E MÉTODOS	57
5.1	Origem e manutenção dos fungos endofíticos	57
5.2	Identificação dos fungos endofíticos	58
5.3	Cultivo e obtenção dos extratos brutos dos fungos endofíticos para a triagem da atividade antifúngica	59
5.4	Preparo das soluções estoques dos extratos de fungos endofíticos	59
5.5	Ensaio biológicos	59
5.5.1	Leveduras utilizadas nos ensaios biológicos	59
5.5.2	Preparo do inóculo de <i>Cryptococcus</i> spp.	60
5.5.3	Ensaio de triagem dos fungos endofíticos por microdiluição	60
5.5.4	Ensaio para determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	62
5.6	Estudo químico biomonitorado do fungo endofítico UFMGCB 2032 para atividade antifúngica	63

5.6.1	Cultivo e extração em larga escala do fungo endofítico UFMGCB 2032 e avaliação da atividade antifúngica	63
5.6.2	Partição líquido-líquido com solventes de polaridades crescentes do extrato bruto do fungo endofítico UFMGCB 2032	63
5.6.3	Métodos cromatográficos	64
5.6.3.1	Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e soluções reveladoras	64
5.6.3.2	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	64
5.6.3.3	Fracionamento 1 por CLAE em escala semi-preparativa e avaliação da atividade antifúngica	65
5.6.3.4	Fracionamento 2 por CLAE em escala semi-preparativa e avaliação da atividade antifúngica	65
5.6.3.5	Avaliação da pureza das substâncias isoladas	66
5.6.4	Métodos Físicos	66
5.6.4.1	Espectros de massas (EM)	66
5.6.4.2	Espectros de ressonância magnética nuclear	66
5.6.5	Ensaio com as substâncias isoladas	67
5.6.5.1	Ensaio de combinação de substâncias	67
5.6.5.2	Ensaio com linhagens de células tumorais humanas ou de atividade citotóxica ..	68
5.6.5.3	Ensaio com formas amastigotas-like de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> ou de atividade leishmanicida	69
5.6.5.4	Microscopia eletrônica de varredura das espécies de <i>Cryptococcus</i> após tratamento com as substâncias isoladas	70
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
6.1	Avaliação preliminar da atividade antifúngica dos fungos endofíticos	72
6.2	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos fungos endofíticos ativos	74
6.3	Identificação do fungo endofítico ativo UFMGCB 2032	76
6.4	Estudo químico biomonitorado do fungo endofítico UFMGCB 2032 para atividade antifúngica	80
6.4.1	Cultivo, extração em larga escala do FE UFMGCB 2032, partição líquido-líquido e avaliação da atividade antifúngica das frações brutas	80
6.4.2	Fracionamento 1 por CLAE em escala semi-preparativa e avaliação da atividade antifúngica dos grupos de frações	81
6.4.3	Fracionamento e avaliação da atividade antifúngica das sub-frações A001.9 a A001.14	85

6.4.4	Avaliação da pureza das sub-frações por CLAE em escala analítica	93
6.4.5	Identificação e caracterização das substâncias isoladas	95
6.4.6	Determinação dos valores de CIMs frente à diferentes isolados de <i>Cryptococcus</i>	101
6.4.7	Ensaio de combinações de substâncias	104
6.4.8	Ensaio com diferentes alvos biológicos	108
6.4.9	Ensaio de microscopia eletrônica de varredura das leveduras de <i>Cryptococcus</i> tratadas com as substâncias isoladas 1 e 2	109
7	CONCLUSÕES	113
8	PERSPECTIVAS	114
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
	ANEXOS	143

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Porcentagens dos isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* de origem clínica (n = 8.590) e ambiental (n = 1.958) (a). Mapa da distribuição geográfica das leveduras nas Américas Central e do Sul. Os isolados clínicos foram descritos nos países em vermelho e os isolados clínicos e ambientais foram descritos nos países em laranja (b) (COGLIATI, 2013) 27
- Figura 2 Evolução das espécies do complexo de *C. neoformans* que originou a classificação baseada em tipos moleculares. O complexo contém pelo menos duas subespécies, *C. neoformans* e *C. gattii*, que divergiram de um ancestral comum a aproximadamente 37 e 18,5 m. a., respectivamente. Estes foram posteriormente divididos em quatro sorotipos consistindo em pelo menos nove tipos moleculares. A prevalência dos sorotipos em cada tipo molecular está expressa através da linha: sólida - alta, fina - intermediária e tracejada - baixa (LIN; HEITMAN, 2006). m.a. – milhões de anos 28
- Figura 3 Ciclo infectivo de *C. neoformans*. A levedura sobrevive no meio ambiente em solo (contaminado com dejetos de aves) e em árvores. As aves, especialmente os pombos tem sido responsáveis pela dispersão mundial. As leveduras infectam animais como gatos, cabras e coalas; sobrevivem em predadores como insetos, minhocas e amebas; e interagem com outros micro-organismos como bactérias e fungos. As diferentes fontes ambientais podem originar a infecção pulmonar humana pela inalação dos esporos e/ou leveduras dessecadas. Quando o hospedeiro torna-se imunocomprometido, a levedura pode deixar o estado de latência e invadir o SNC que é a forma mais grave da criptococose humana (LIN; HEITMAN, 2006) 29
- Figura 4 Distribuição em porcentagens dos isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* de origem clínica (n = 8.590) e ambiental (n = 1.958) nos diferentes países das Américas Central e do Sul (COGLIATI, 2013) 34
- Figura 5 Estrutura química da anfotericina B (<http://www.drugs.com/pro/amphotericin-b.html>) 35
- Figura 6 Estruturas químicas dos antifúngicos triazólicos: fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol (<http://www.visaoacademica.ufpr.br>) 36
- Figura 7 Esquema da placa de microdiluição. Os ensaios de triagem e CIM foram realizados nas colunas 2 a 11. Como controles na coluna 1: CEM - esterilidade do meio RPMI supl. (poços A-D), CN - controle negativo contendo inóculo e meio de cultura (poços E-H) e na coluna 12: Controle do DMSO – diluente dos extratos (poços A-D) e Controle com antifúngico – AMB (poços E-H) 61
- Figura 8 Gráficos das faixas de porcentagens de inibição encontrados para os extratos de fungos endofíticos das plantas medicinais testados contra as espécies de *C. neoformans* ATCC 24067 e *C. gattii* ATCC 24065 a 500 µg/mL. Plantas medicinais estudadas: *Eugenia* aff. *bimarginata* (1), *Alchornea castaneifolia* (2) e *Myrciaria floribunda* (3) 73

- Figura 9 Gráficos das faixas de porcentagens de inibição encontrados para os extratos de fungos endofíticos das plantas medicinais testados contra as espécies de *C. neoformans* ATCC 24067 e *C. gattii* ATCC 24065 a 500 µg/mL. Plantas medicinais estudadas: *Solanum cernuum* (4), *Stryphnodendron adstringens* (5) e *Carapa guianensis* (6) 74
- Figura 10 Placa de microdiluição com teste para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) frente *C. neoformans* ATCC 24067. Os poços das linhas G e H entre as colunas 2 a 11 contêm concentrações decrescentes do extrato do fungo endofítico 2032 (500 a 0,97 µg/mL). Os poços das colunas 1 (G e H) e 12 (G e H) são os controles de crescimento da leveduras e do antifúngico, respectivamente. A CIM corresponde aos poços da coluna 6 com extrato bruto do fungo endofítico UFMGCB 2032 a 31,25 µg/mL 75
- Figura 11 Placa de microdiluição com teste para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) frente *C. gattii* ATCC 24065. Os poços das linhas A e B entre as colunas 2 a 11 contêm concentrações decrescentes do extrato do fungo endofítico UFMGCB 2032 (500 a 0,97 µg/mL). Os poços das colunas 1 (A e B) e 12 (A e B) são os controles de esterilidade do meio e do diluente dos extratos (dimetilsulfóxido), respectivamente. A CIM corresponde aos poços da coluna 8 com extrato bruto do fungo endofítico UFMGCB 2032 a 7,80 µg/mL 75
- Figura 12 Árvore filogenética de máxima verossimilhança do FE *Mycosphaerella* spp. UFMGCB 2032 após sequenciamento da região ITS do RNA ribossomal e comparação com sequências de outras espécies pertencentes ao gênero *Mycosphaerella* através do programa MEGA. Os números nos nós indicam o suporte de “bootstrap” para 1.000 replicatas. A árvore foi construída utilizando dois isolados dos gêneros *Passalora* e *Botryosphaeria* 78
- Figura 13 Placa de cultivo do fungo endofítico UFMGCB 2032 após 15 dias de incubação a 25°C em agar batata dextrose. À esquerda; vista do fundo (colônia verde oliva com pregas longitudinais e bordas brancas) e à direita; vista de frente (colônias verdes acinzentadas) 81
- Figura 14 Perfil cromatográfico do fracionamento 1 em CLAE em escala semi-preparativa da fração solúvel em AcOEt obtida do micélio do FE *Mycosphaerella* spp. UFMGCB 2032. A fração solúvel em AcOEt obtida a partir do micélio foi eluída com gradiente de MeOH: H₂O Milli-Q (10-50% MeOH até 30 min.; 50-95% até 50 min. 95-100 % até 51 min. e 100 % em 68 min.) e fluxo de 8,0 mL/min. Linha azul representa a absorvância medida em 220 nm e a linha preta a absorvância medida em 254 nm. A chave marca o intervalo de tempo (entre 39 e 51 min.) no qual eluíram as frações contendo substâncias ativas e de massa superior a 35,0 mg (A001.9-A001.14) 83
- Figura 15 Perfil cromatográfico do fracionamento 1 em CLAE em escala semi-preparativa da fração solúvel em AcOEt obtida do meio BDA do FE *Mycosphaerella* spp. UFMGCB 2032. A fração solúvel em AcOEt obtida a partir do micélio foi eluída com gradiente de MeOH: H₂O Mili-Q (10-50% MeOH até 30 min.; 50-95% até 50 min. 95-100 % até 51 min. e 100 % em 68 min.) e fluxo de 8,0 mL/min. Linha azul representa a absorvância medida em 220 nm e a linha preta a absorvância medida em 254 nm. A chave marca o intervalo de tempo (entre 39 e 51 min.) no qual eluíram as frações contendo substâncias ativas e de massa superior a 35,0 mg (A001.9-A001.14) 84

- Figura 16 Perfil cromatográfico da fração A001.9 obtida da fração solúvel em AcOEt do FE *Mycosphaerella* spp. UFMGCB 2032, fracionada em CLAE em escala semi-preparativa. A fração foi eluída com gradiente de acetonitrila (ACN) e H₂O (30% ACN até 10 min.; 30-50% até 24 min.; 50-75% até 50 min.; 75-100% até 60 min. e 100% em 90 min.) e fluxo de 8,0 mL/min. Linha azul representa a absorvância medida em 220 nm e a linha preta a absorvância medida em 200 nm. A seta cheia indica o pico da sub-fração ativa A001.9.17 de massa 14,5 mg que eluiu da coluna entre 28,1-30,1 minutos, e a seta pontilhada indica o pico da sub-fração ativa A001.9.19 de massa 6,7 mg que eluiu da coluna entre 32,4-34,5 minutos 86
- Figura 17 Perfil cromatográfico da fração A001.10 obtida da fração solúvel em AcOEt do FE *Mycosphaerella* spp. UFMGCB 2032, fracionada em CLAE em escala semi-preparativa. A fração foi eluída com gradiente de acetonitrila (ACN) e H₂O (30% ACN até 10 min.; 30-50% até 24 min.; 50-75% até 50 min.; 75-100% até 60 min. e 100% em 90 min.) e fluxo de 8,0 mL/min. Linha azul representa a absorvância medida em 220 nm e a linha preta a absorvância medida em 200 nm. A seta cheia indica o pico da sub-fração ativa A001.10.16 de massa 10,6 mg que eluiu da coluna entre 21,7-22,8 minutos 87
- Figura 18 Perfil cromatográfico da fração A001.11 obtida da fração solúvel em AcOEt do FE *Mycosphaerella* spp. UFMGCB 2032, fracionada em CLAE em escala semi-preparativa. A fração foi eluída com gradiente de acetonitrila (ACN) e H₂O (30% ACN até 10 min.; 30-50% até 24 min.; 50-75% até 50 min.; 75-100% até 60 min. e 100% em 90 min.) e fluxo de 8,0 mL/min. Linha azul representa a absorvância medida em 220 nm e a linha preta a absorvância medida em 200 nm. A seta cheia indica o pico da sub-fração ativa A001.11.15 de massa 4,0 mg que eluiu da coluna entre 28,5-29,7 minutos, e a seta pontilhada indica o pico da sub-fração ativa A001.11.18 de massa 5,3 mg que eluiu da coluna entre 31,1-32,5 minutos ... 88
- Figura 19 Perfil cromatográfico da fração A001.12 obtida da fração solúvel em AcOEt do FE *Mycosphaerella* spp. UFMGCB 2032, fracionada em CLAE em escala semi-preparativa. A fração foi eluída com gradiente de acetonitrila (ACN) e H₂O (30% ACN até 10 min.; 30-50% até 24 min.; 50-75% até 50 min.; 75-100% até 60 min. e 100% em 90 min.) e fluxo de 8,0 mL/min. Linha azul representa a absorvância medida em 220 nm e a linha preta a absorvância medida em 200 nm. A seta cheia indica o pico da sub-fração ativa A001.12.27 de massa 5,0 mg que eluiu da coluna entre 31,5-32,5 minutos, e a seta pontilhada indica o pico da sub-fração ativa A001.12.29 de massa 5,9 mg que eluiu da coluna entre 32,8-33,8 minutos ... 89
- Figura 20 Perfil cromatográfico da fração A001.13 obtida da fração solúvel em AcOEt do FE *Mycosphaerella* spp. UFMGCB 2032, fracionada em CLAE em escala semi-preparativa. A fração foi eluída com gradiente de acetonitrila (ACN) e H₂O (30% ACN até 10 min.; 30-50% até 24 min.; 50-75% até 50 min.; 75-100% até 60 min. e 100% em 90 min.) e fluxo de 8,0 mL/min. Linha azul representa a absorvância medida em 220 nm e a linha preta a absorvância medida em 200 nm. A seta cheia indica o pico da sub-fração ativa A001.13.26 de massa 7,4 mg que eluiu da coluna entre 36,0-37,4 minutos, e a seta pontilhada indica o pico da sub-frações ativas A001.13.27 e 13.28 (com a mesma substância) de massa 12,3 mg que eluíram da coluna entre 37,4-38,9 minutos 90

- Figura 21 Perfil cromatográfico da fração A001.14 obtida da fração solúvel em AcOEt do FE *Mycosphaerella* spp. UFMGCB 2032, fracionada em CLAE em escala semi-preparativa. A fração foi eluída com gradiente de acetonitrila (ACN) e H₂O (30% ACN até 10 min.; 30-50% até 24 min.; 50-75% até 50 min.; 75-100% até 60 min. e 100% em 90 min.) e fluxo de 8,0 mL/min. Linha azul representa a absorbância medida em 220 nm e a linha preta a absorbância medida em 200 nm. A seta cheia indica o pico da sub-fração ativa A001.14.15 de massa 21,5 mg que eluiu da coluna entre 39,3-40,9 minutos, e a seta pontilhada indica o pico da sub-fração ativa A001.14.17 de massa 4,4 mg que eluiu da coluna entre 41,4-42,2 minutos ... 91
- Figura 22 Perfil de substâncias oriundos das sub-frações com massa superior a 4,0 mg após análise por CCD. As CCDs foram eluídas com CHCl₃:MeOH:NH₄OH nas seguintes proporções: (a e b) 10:2,25:0,5; (c) 10:3,25:0,5 e (d) 10:4,5:0,5. Linha pontilhada: manchas fluorescentes em 254 nm, linha cheia: manchas fluorescente em 366 nm e retângulos: manchas reveladas com vapor de iodo. As manchas coloridas foram obtidas após revelação com mistura de vanilina/H₂SO₄ e aquecimento 92
- Figura 23 Perfil cromatográfico das sub-frações A001.13.27 e A001.14.15 obtidas no fracionamento 2 em CLAE em escala semi-preparativa. As frações foram eluídas com gradiente de acetonitrila (ACN) e H₂O Milli-Q (30% ACN até 5 min.; 30-50% até 12 min.; 50-75% até 25 min.; 75-100% até 30 min. e 100% até 45 min.) e fluxo de 1,0 mL/min. Linha azul representa a absorbância medida em 220 nm e a linha preta a absorbância em 200 nm 93
- Figura 24 Esquema geral do fracionamento da fração AcOEt até isolamento das substâncias ativas. O fracionamento cromatográfico foi biomonitorado através de ensaios de microdiluição com *C. neoformans* ATCC 24067 (*C. n.*) e *C. gattii* ATCC 24065 (*C.g.*). CIM – Concentração inibitória mínima e t.r. – tempo de retenção das substâncias isoladas 94
- Figura 25 Representação dos experimentos realizados para identificação da substância **1** isolada do FE *Mycosphaerella* spp. UFMGCB 2032. **a**: estrutura química, fórmula molecular (FM) e massa molecular (MM); **b**: perfil de U.V. com λ máximo em 227 nm; **c**: espectro da RMN de ¹H e **d**: espectro de RMN de ¹³C e **e**: espectros de massas 99
- Figura 26 Representação dos experimentos realizados para identificação da substância **2** isolada do FE *Mycosphaerella* spp. UFMGCB 2032. **a** estrutura química, formula molecular (FM) e massa molecular (MM); **b** perfil de U.V.; **c** espectro da RMN de ¹H e **d** espectro de RMN de ¹³C e **e**: espectros de massas 100
- Figura 27 Curvas de combinação das quatro associações sinérgicas encontradas entre o antifúngico e a substância isolada frente às espécies de *Cryptococcus*. **a** – Fluconazol com a substância **1** frente a *C. neoformans* ATCC 24067, **b** – anfotericina B (AMB) com a substância **2** frente a *C. neoformans* ATCC 28957, **c** – AMB com a substância **1** e **d** – AMB com a substância **2** frente a *C. gattii* ATCC 32608 107

Figura 28	Microscopia eletrônica de varredura de <i>C. neoformans</i> ATCC 24067 (A) e <i>C. gattii</i> ATCC 24065 (B). As leveduras foram cultivadas por 3 dias a 30°C em RPMI supl. (controles sem antifúngico A.0 e B.0), e na presença das substâncias 1 (A.1 e B.1) e 2 (A.2 e B.2) nas concentrações subinibitória de 2,0 µg/mL e 0,3 µg/mL, respectivamente. Podem ser observadas deformações no formato das leveduras (seta branca), depressões na superfície (setas pretas) e enrugamento acentuado (seta pontilhada). Aumento de 10.000 X e as barras representam 3,0 µm	110
Figura 29	Estruturas químicas das substâncias 1 , substância 2 (Miriocina) e esfingofunginas B e C (BRUNNER; KOSKINE, 2004)	111
Figura 30	Espectro no U.V. da substância 1 (200-800 nm)	145
Figura 31	Espectro de Massas da substância 1 (A01.13.27): mK_neg_30eV e mk_pos_30eV.....	146
Figura 32	Perfil de fragmentação da substância 1 (A01.13.27) – perfil 1.....	147
Figura 33	Perfil de fragmentação da substância 1 (A01.13.27) – perfil 2.....	148
Figura 34	Espectro de RMN de ¹ H da substância 1 - A001.13.27 (400 MHz, DMSO, δ)	149
Figura 35	Ampliação 1 do espectro de RMN de ¹ H da substância 1 - A001.13.27 (400 MHz, DMSO, δ)	150
Figura 36	Ampliação 2 do espectro de RMN de ¹ H da substância 1 - A001.13.27 (400 MHz, DMSO, δ)	151
Figura 37	Mapa de contornos COSY da substância 1 - A001.13.27 (400 MHz, DMSO, δ) ...	152
Figura 38	Ampliação 1 do mapa de contornos COSY da substância 1 - A001.13.27 (400 MHz, DMSO, δ)	153
Figura 39	Ampliação 2 (COSY B) e 3 (COSY C) do mapa de contornos COSY da substância 1 - A001.13.27 (400 MHz, DMSO, δ)	154
Figura 40	Espectro de HMBC da substância 1 - A001.13.27 (400 MHz, DMSO, δ)	155
Figura 41	Ampliação 1 (HMBCa) e 2 (HMBCb) do mapa de contornos HMBC da substância 1 (A001.13.27)	156
Figura 42	Ampliação 3 (HMBCc) e 4 (HMBCd) do mapa de contornos HMBC da substância 1 (A001.13.27)	157
Figura 43	Espectro de HSQC da substância 1 (A001.13.27)	158
Figura 44	Ampliação 1 (HSQCa) e 2 (HSQCb) do mapa de contornos HSQC da substância 1 (A001.13.27)	159
Figura 45	Ampliação 2 (HSQCb) e 4 (HSQCd) do mapa de contornos HSQC da substância 1 (A001.13.27)	160
Figura 46	Espectro de RMN de ¹³ C e da substância 1 - A001.13.27 (100 MHz, DMSO, δ) ...	161
Figura 47	Ampliação 1 do espectro de RMN de ¹³ C da substância 1 - A001.13.27 (100 MHz, DMSO, δ)	162
Figura 48	Espectro de RMN de ¹³ C (Dept-90) da substância 1 - A001.13.27 (100 MHz, DMSO, δ)	163

Figura 49	Ampliação 1 do espectro de RMN de ^{13}C (Dept-90) da substância 1 - A001.13.27 (100 MHz, DMSO, δ)	164
Figura 50	Espectro de RMN de ^{13}C (Dept-135) da substância 1 - A001.13.27 (100 MHz, DMSO, δ)	165
Figura 51	Ampliação 1 do espectro de RMN de ^{13}C (Dept-135) da substância 1 - A001.13.27 (100 MHz, DMSO, δ)	166
Figura 52	Ampliação 2 do espectro de RMN de ^{13}C (Dept-135) da substância 1 - A001.13.27 (100 MHz, DMSO, δ)	167
Figura 53	Espectro no U.V. da substâncias 2 (200-800 nm)	168
Figura 54	Espectro de Massas da substância 2 (A01.14.15): mK_neg_30eV e mK_pos_30eV	169
Figura 55	Perfil de fragmentação da substância 2 (A01.14.15) – perfil 1.....	170
Figura 56	Perfil de fragmentação da substância 2 (A01.14.15) – perfil 2	171
Figura 57	Espectro de RMN de ^1H da substância 2 - A001.14.15 (400 MHz, DMSO, δ)	172
Figura 58	Ampliação 1 do espectro de RMN de ^1H da substância 2 - A001.14.15 (400 MHz, DMSO, δ)	173
Figura 59	Mapa de contornos COSY da substância 2 - A001.14.15 (400 MHz, DMSO, δ) ...	174
Figura 60	Ampliação 1 do mapa de contornos COSY da substância 2 - A001.14.15 (400 MHz, DMSO, δ)	175
Figura 61	Espectro de HMBC da substância 2 (A001.14.15)	176
Figura 62	Ampliação 1 (HMBCa) e 2 (HMBCb) do mapa de contornos HMBC da substância 2 - A001.14.15 (400 MHz, DMSO, δ)	177
Figura 63	Ampliação 3 (HMBCc) e 4 (HMBCd) do mapa de contornos HMBC da substância 2 (A001.14.15)	178
Figura 64	Espectro de HSQC da substância 2 (A001.14.15)	179
Figura 65	Ampliação 1 (HSQCa) e 2 (HSQCb) do mapa de contornos HSQC da substância 2 (A001.14.15)	180
Figura 66	Ampliação 3 (HSQCc) e 4 (HSQCd) do mapa de contornos HSQC da substância 2 (A001.14.15)	181
Figura 67	Espectro de RMN de ^{13}C e da substância 2 - A001.14.15 (100 MHz, DMSO, δ) ...	182
Figura 68	Ampliação 1 do espectro de RMN de ^{13}C da substância 2 - A001.14.15 (100 MHz, DMSO, δ)	183
Figura 69	Espectro de RMN de ^{13}C (Dept-90) da substância 2 - A001.14.15 (100 MHz, DMSO, δ)	184
Figura 70	Espectro de RMN de ^{13}C (Dept-135) da substância 2 - A001.14.15 (100 MHz, DMSO, δ)	185
Figura 71	Ampliação 1 do espectro de RMN de ^{13}C (Dept-135) da substância 2 - A001.14.15 (100 MHz, DMSO, δ)	186
Figura 72	Ampliação 2 do espectro de RMN de ^{13}C (Dept-135) da substância 2 - A001.14.15 (100 MHz, DMSO, δ)	187

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Metabólitos secundários de micro-organismos endofíticos provenientes de espécies vegetais com atividade biológica de interesse médico nos últimos 6 anos (YU et al., 2010 ¹ e outras referências ²)	45
Tabela 2	Espécies de plantas, parte coletada, habitat, localização por GPS e total de extratos de fungos endofíticos (EFE) avaliados contra as duas espécies de <i>Cryptococcus</i>	57
Tabela 3	Espécies de plantas e códigos dos fungos endofíticos avaliados contra as duas espécies de <i>Cryptococcus</i>	58
Tabela 4	Fungos dos gêneros <i>Mycosphaerella</i> , <i>Passalora</i> e <i>Botryosphaeria</i> comparados ao FE <i>Mycosphaerella</i> spp. UFMGCB 2032, código da sequência ITS no Genbank, autores e ano da publicação (CROUS et al., 2006)	77
Tabela 5	Metabólitos secundários produzidos pelo gênero <i>Mycosphaerella</i> , alvos biológicos, autor e ano	79
Tabela 6	Resultado do fracionamento 1 da fração AcOEt do FE <i>Mycosphaerella</i> spp. UFMGCB 2032 por CLAE em escala semi-preparativa. Massa dos grupos de frações e resultados dos ensaios de atividade antifúngica realizados por microdiluição na concentração de 250 µg/mL frente às duas espécies de <i>Cryptococcus</i>	85
Tabela 7	Resultado do fracionamento das sub-frações A001.9 a A001.14 por CLAE em escala semi-preparativa. Número de sub-frações, sub-frações com massa superior a 4,00 mg e valores de CIMs obtidos por ensaios de microdiluição frente as espécies de <i>Cryptococcus</i>	92
Tabela 8	Atribuições dos sinais dos espectros de RMN de ¹ H e de ¹³ C para as substâncias 1 e 2 isoladas do FE <i>Mycosphaerella</i> spp. UFMGCB 2032	96
Tabela 9	Valores da Concentração Inibitória Mínima – CIM do extrato bruto, fração acetato de etila (AcOEt), substâncias isoladas 1 e 2 , anfotericina B (AMB) e fluconazol (FC) contra diferentes isolados de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> ..	102
Quadro 1	Grupos de CIMs comparados entre as duas espécies de <i>Cryptococcus</i> estatisticamente no programa GraphPad versão 5.0 (teste de Wilcoxon), valores de P obtidos e resultado da análise estatística	103
Quadro 2	Grupos de CIMs para os dois isolados de <i>Cryptococcus</i> (n = 15) comparados estatisticamente no programa GraphPad versão 5.0 (teste de Wilcoxon), valores de P obtidos e resultado da análise estatística (diferença significativa)	104
Tabela 10	Resultado do ensaio de combinação das substâncias 1 e 2 com os antifúngicos anfotericina B (AMB) e Fluconazol (FC) frente a dois isolados de <i>C. neoformans</i> (ATCC 24067 e ATCC 28957) e dois de <i>C. gattii</i> (ATCC 24065 e ATCC 32608)	106
Tabela 11	Resultados dos ensaios com as substâncias 1 e 2 em diferentes alvos biológicos: CIM contra <i>Candida albicans</i> e <i>C. krusei</i> ; e porcentagens de inibição sobre as duas linhagens de células tumorais humana (MCF-7 e TK-10) e sobre <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> a 20 µg/mL	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
AMB	Anfotericina B
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BDA	Agar batata dextrose
CCD	Cromatografia em Camada delgada
CDC	‘Centers for Disease Control and Prevention’
CEM	Controle de esterilidade do meio
CI ₈₀	Concentração capaz de inibir o crescimento em 80 %
CIF	Concentração Inibitória Fracional
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE ou ‘HPLC’	Cromatografia Líquida de Alta eficiência
CLSI	<i>‘Clinical and Laboratory Standards Institute’</i>
d.i.	Diâmetro interno
DMSO	Dimetilsulfóxido
EFE	Extrato de fungo endofítico
EM	Espectrometria de massa
EUCAST	<i>‘European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing’</i>
FC	Fluconazol
FDA	‘Food and Drugs Administration’
FE	Fungo endofítico
FM	Fórmula Molecular
GPS	‘Global positioning system’
ICIF	Índice da Concentração Inibitória Fracional
MeOH	Metanol
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MM	Massa Molecular
MOPS	Ácido 3-N-morfolinopropanosulfônico
MTT	Corante: ‘methyl thiazolyl tetrazolium’
MV	Máxima verossimilhança
p/v	Peso por volume
r.f.	‘retention factor’ = Fator de retenção
RMN	Ressonância magnética nuclear
RPMI supl.	Meio RPMI 1640 suplementado com glicose (2%) e MOPS

S-DD	Sensível dose dependente
SE	Solução estoque
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ST	Solução de trabalho
SNC	Sistema Nervoso Central
TMS	Tetrametilsilano
tr	Tempo de retenção
U.V.	Ultravioleta
var.	Variedade
v/v	Volume por volume
WHO	'World Health Organization'

RESUMO

A criptococose é uma doença fúngica de caráter oportunista, porém pode acometer pessoas saudáveis. A doença é causada principalmente por *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. O número de fármacos antifúngicos para o tratamento da doença é restrito, e por isso buscou-se novos fármacos dentre os fungos endofíticos (FE). A triagem foi realizada por microdiluição com 401 extratos etanólicos de FE isolados de seis plantas medicinais. O único extrato de FE com atividade antifúngica constante foi do FE UFMGCB 2032, identificado como *Mycosphaerella* spp., oriundo da planta *Eugenia* aff. *bimarginata* Berg. coletada no cerrado brasileiro. O fungo foi cultivado em larga escala, o extrato bruto foi particionado com solventes orgânicos e a fração solúvel em acetato de etila fracionada por cromatografia líquida de alta eficiência. Duas substâncias foram isoladas e identificadas por espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear. A substância **1** foi isolada pela primeira vez e identificada como o ácido (6E, 12E)-2-amino-3,4-diidroxi-2-(hidróximetil)-14-oxo-icosa-6,12-dienóico e obteve faixa de concentração inibitória mínima (CIM) entre 0,19-3,12 µg/mL. A substância **2** foi identificada como o ácido (6E)-2-amino-3,4-diidroxi-2-(hidróximetil)-14-oxo-icosa-6-enóico ou miriocina (CIM 0,19-0,78 µg/mL). As substâncias **1** e **2** foram ativas contra os diferentes isolados de *Cryptococcus* avaliados com CIMs semelhantes as CIMs da anfotericina B (AMB) e menores que as CIMs do fluconazol (FC). Os ensaios de combinação das duas substâncias com a AMB e o FC mostraram 25 % de sinergismo. As duas substâncias foram ativas contra *Candida albicans* e *C. krusei*. As substâncias **1** e **2** apresentam baixas taxas de atividade citotóxica contra as células tumorais humanas MCF-7 e TK-10 e baixas porcentagens de inibição contra a forma amastigota-like de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. A microscopia eletrônica de varredura das leveduras após tratamento com as substâncias mostrou modificações no formato, depressões e enrugamento na superfície e *C. gattii* também sofreram redução no tamanho e ausência de brotos nas células mãe.

Palavras-chave: *Cryptococcus*, criptococose, fungo endofítico, *Mycosphaerella*, antifúngico.

ABSTRACT

Cryptococcosis is an opportunistic fungal disease that may affect healthy people. The disease is mainly caused by *C. neoformans* and *C. gattii* yeasts. The options of antifungal drugs available for the treatment are limited, so we search for new antifungal agents among the endophytic fungi (EF). Antifungal trial assays were performed by broth microdilution with 401 ethanolic endophytic fungi extracts isolated from six medicinal plants. The only isolated with constant antifungal activity was the UFMGCB 2032, identified as *Mycosphaerella* sp., obtained from the medicinal plant *E. aff. bimarginata* Berg., collected from Brazilian savannah. The fungal was grown on a large scale, the crude extract was submitted to partition with organic solvents, and the ethyl acetate fraction was fractionated by HPLC, which produced two secondary metabolites identified by mass spectra and NMR assays. The (6E, 12E)-2-amino-3,4-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)-14-oxo-icosa-6,12-dienoic acid, compound 1, it was isolated by the first time and showed minimal inhibitory concentration (MIC) rate of 0.19-3.12 µg/mL. The second compound was the (6E)-2-amino-3,4-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)-14-oxo-icosa-6-enoic acid, compound 2 or myriocin (MIC 0.19-0.78 µg/mL). The two isolated compounds showed antifungal activity against the *Cryptococcus* species isolates evaluated with MIC values similar to amphotericin B (AMB) MIC, and lower than fluconazole (FC) MIC values. The combined drugs assays indicate 25 % of synergism performed with compounds 1 and 2 combined with AMB and FC. The two compounds also exhibited activity against *Candida albicans* and *C. krusei*. The compounds 1 and 2 showed low cytotoxicity rate against MCF-7 and TK-10, and low inhibition percentage against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Scanning electronic microscopy of the yeasts treated with isolated compounds permitted the observation of modification in yeasts shape (deformation) and cell wall modifications (depressions and additional wrinkles). Moreover, reduction in the *C. gattii* size and absence of budding cells yeasts after treatment was seen.

Key words: *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, cryptococcosis, endophytic fungal, *Mycosphaerella*, antifungal.

1 INTRODUÇÃO

A criptococose é uma infecção fúngica causada principalmente pelas leveduras *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, e raramente, por leveduras denominadas não-*neoformans* que integram o complexo *Cryptococcus*. Tais leveduras apresentam caráter oportunista, uma vez que atingem pacientes imunocomprometidos em decorrência a terapias imunossupressoras, doenças autoimunes ou com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). Após epidemia de SIDA, a infecção por criptococose tornou-se mais frequente e grave, acometendo entre 5-10% dos pacientes soropositivos (JABBOUR et al., 1996; HELLOU et al., 1999; HUSAIN; WAGENER; SINGH, 2001; BERGOLD; GEORGIADIS, 2004; LIN; HEITMAN, 2006; CORTIJO et al., 2006; BRASIL, 2010). A doença pode ser fatal e sua mortalidade chega quase a 30 % nos países onde a terapia antirretroviral não está disponível (LIN; HEITMAN, 2006). No Brasil, entre 1996 e 2006, um estudo sobre as infecções fúngicas sistêmicas em pacientes soropositivos aponta que 50,9 % dos óbitos ocorreram por criptococose (PRADO et al., 2009). Embora seja considerada oportunista, diversos relatos de criptococose em indivíduos imunocompetentes já foram descritos em muitos países, inclusive no Brasil (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; LACAZ, et al. 2002; OLIVEIRA et al., 2007; LINDENBERG et al., 2008; SOARES et al., 2008; MARQUES et al, 2012; MORA et al., 2012; BELLO et al., 2013).

A criptococose pode ser adquirida pela inalação de propágulos da levedura encontrada na natureza em solos altamente nitrogenados, tais como em locais onde há acúmulo de fezes de pombos e material vegetal em decomposição onde as mesmas mantêm-se viável por anos (KWON-CHUNG; BENNETT, 1984; BARONI et al., 2006). A doença pode manifestar-se nas formas cutânea e sistêmica. Nesta última, acomete os pulmões e pode chegar ao sistema nervoso central e assim, agravar os sintomas clínicos (CASADEVALL; PERFECT, 1998; BRASIL, 2010).

O tratamento para a criptococose depende do estado imune do paciente e do local da infecção. Este pode ser realizado com agentes antifúngicos como azóis, polienos e análogos de nucleotídeos, e também pode ser feita a drenagem do fluido cérebro espinhal e ocasionalmente a cirurgia para remoção do foco infeccioso (SAAG, et al. 2000; HUSTON; MODY, 2009). No Brasil, o tratamento recomendado depende da forma clínica (cutânea ou sistêmica). A anfotericina B é utilizada na fase aguda e os azóis (fluconazol e itraconazol) na profilaxia da doença (SAAG et al., 1992; BRASIL, 2010). Embora exista tratamento para a

criptococose, a necessidade da busca de novos fármacos dá-se pelo fato de ser limitado o número de substâncias antifúngicas disponíveis, e por estas apresentarem efeitos colaterais graves. Como o diagnóstico inicial da doença é difícil e muitas vezes demorado, um novo antifúngico sem as complicações dos fármacos empregados atualmente colaboraria para que não houvessem elevados índices de falha terapêutica, evitaria o desenvolvimento das sequelas neurológicas graves e poderia reduzir as taxas de óbito dos pacientes (NUCCI, PERFECT, 2008; JARVIS et al., 2010).

Portanto, diante da limitação das terapias antifúngicas existentes, a bioprospecção dos produtos naturais oriundos de fungos endofíticos associados a plantas medicinais pode ser considerada uma estratégia válida na busca de novos fármacos, uma vez que as plantas medicinais já são utilizadas pelos seres humanos desde a antiguidade, e que cerca de 80 % dos fungos endofíticos (FE) produzem substâncias bioativas ainda não avaliadas contra criptococose e outras doenças fúngicas (SCHULZ; BOYLE, 2005; W.H.O., 2008).

Como ferramentas para avaliação da atividade antimicrobiana dos FE durante a bioprospecção, a literatura descreve os ensaios biológicos empregando metodologias *in vitro* em meio sólido, como o teste de difusão a partir de disco; e em meio líquido, como os ensaios de microdiluição e macrodiluição (pouco empregada pelo elevado gasto tanto de amostra a ser testada quanto de insumos laboratoriais). As vantagens da metodologia de difusão em meio sólido são a facilidade de execução e o baixo custo; e da microdiluição são o emprego de menor quantidade de meio de cultura e sua padronização ter sido estabelecida por comitês internacionais para testes de sensibilidade aos antifúngicos frente a leveduras patogênicas (CLSI, 2002; CLSI, 2004; EUCAST, 2002; SCORZONI et al., 2007). As diferentes etapas da bioprospecção dos extratos de FE e suas frações podem ser monitoradas pelos diferentes ensaios biológicos supracitados, e este acompanhamento é benéfico, pois auxilia na tomada de decisões relativas às demais etapas do fracionamento, e assim, agiliza o isolamento das substâncias mais ativas e torna o processo de bioprospecção menos dispendioso (SCORZONI et al., 2007).

Assim, diante da incidência crescente de casos de criptococose e do número restrito de antifúngicos, a necessidade da busca de novas alternativas de fármacos é evidente, e os fungos endofíticos depositados na coleção e Células do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG constituem uma fonte interessante de metabólitos secundários a serem explorados nos ensaios de bioprospecção de atividade antifúngica contra as duas principais espécies de *Cryptococcus* causadoras da criptococose.

2 JUSTIFICATIVA

As novas técnicas de tratamento das doenças adotadas pela medicina moderna, como o emprego de corticóides, transplantes de órgãos e a prática de procedimentos invasivos, trazem como consequências a incidência crescente de pacientes imunocomprometidos e aumento do número de casos de doenças infecciosas de caráter oportunista como a criptococose. Juntamente aos fatores já mencionados somam-se o uso indiscriminado de antimicrobianos, surgimento de isolados resistentes aos antifúngicos e o elevado número de pacientes com SIDA que contribuem para aumento do número de casos de criptococose. Além disso, também existem surtos da doença acometendo pacientes imunocompetentes em diferentes países e em locais de clima temperado. Assim, pelos motivos já citados, torna-se necessária a busca de novas alternativas farmacológicas para o tratamento da criptococose.

Em paralelo à pesquisa na procura de informações adicionais sobre os fungos causadores das infecções está a busca de novos agentes com propriedades antimicrobianas das mais variadas origens, seja por síntese ou a partir de produtos naturais. Dentro desta última categoria, os micro-organismos despontam como grupo de interesse tanto biotecnológico quanto médico, uma vez que mais de 23.000 substâncias ativas já foram isoladas de micro-organismos (DEMAIN, 2013). Estes são objeto dos estudos de bioprospecção, pois são conhecidamente fontes de substâncias com atividade antimicrobiana ainda pouco explorada.

A bioprospecção de metabólitos secundários oriundos de fungos endofíticos associados a plantas foi realizado com plantas medicinais, pelo fato de que cerca de 70% da população dos países em desenvolvimento utilizam produtos naturais obtidos a partir destas como alternativa primária e única para restabelecimento e manutenção da saúde segundo dados da Organização Mundial de Saúde em 2008. Além disso, cerca de 40 % das 23.000 substâncias ativas isoladas de micro-organismos foram produzidas por fungos (DEMAIN, 2013).

Portanto, diante do número crescente de casos de criptococose, quantidade restrita de fármacos antifúngicos, complexidade do tratamento das infecções (em especial às provocadas por *C. gattii*), pelos relatos de resistência e/ou tolerância aos antifúngicos, e o potencial farmacológico inexplorado dos fungos endofíticos foi realizado o presente trabalho para a avaliação do potencial antifúngico dos fungos endofíticos da coleção de Micro-organismos e Células do ICB da UFMG. O trabalho justifica-se também por serem escassas as investigações de atividade antifúngica utilizando as espécies patogênicas de *Cryptococcus*

como alvo, e por serem poucos os trabalhos que abrangem desde a etapa de triagem até o isolamento e identificação dos metabólitos secundários produzidos pelos fungos endofíticos associados a plantas medicinais encontradas nos diferentes biomas brasileiros.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Cryptococcus* spp.

O gênero *Cryptococcus* é composto por pelo menos 70 espécies de leveduras que distribuem-se mundialmente. Estas podem ser de vida livre sendo encontrados em solos, poeiras e locais contaminados com fezes de aves (pombos, galinhas, papagaios, perus e canários), em árvores (*Eucalyptus* spp., *Prunus dulcis*, *Caesalpinia peltophoroides* e *Anadenanthera peregrine*), madeiras em decomposição e insetos; e provocando infecções em animais (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; MITCHELL; PERFECT, 1995; CASADEVALL, PERFECT, 1998; LACAZ, 2002; CORTIJO et al., 2006; LIN; HEITMAN, 2006; PEDROSO et al., 2007; KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011; COGLIATI, 2013).

A forma anamórfica dos fungos deste gênero reproduz-se por brotamento e sua fase teleomórfica ou sexuada é um basidiomiceto pertencente ao gênero *Filobasidiella* que pode se reproduzir assexuada ou sexuadamente gerando descendentes com tipo de acasalamento ('mating type') α ou a. A fase teleomórfica de *C. neoformans* ainda não foi observada na natureza. Os cruzamentos *in vitro* das leveduras com 'mating type' opostos produzem hifas dicarióticas que durante processo de divisão nuclear formam conexões em forma de grampo que é característica dos fungos basidiomicéticos. Algumas das hifas dicarióticas apicais se diferenciam em basídio que, após meiose, formam os basidiósporos uninucleados. Os experimentos realizados promovendo diferentes cruzamentos permitiram definir duas espécies com base na morfologia dos basidiósporos, *Filobasidiella neoformans* e *F. bacillispora* que correspondem respectivamente aos anamorfos *C. neoformans* e *C. gattii* (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; CASADEVALL; PERFECT, 1998; KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

3.2 Características morfológicas e classificação das leveduras

As leveduras do gênero *Cryptococcus* são encapsuladas, e em meio sólido formam colônias com aspecto cremoso. Contudo, as colônias de *C. gattii* sob tais condições de cultivo apresentam aspecto mucóide. Morfologicamente, as leveduras de *C. neoformans* apresentam formato entre esférico a oval, enquanto as células de *C. gattii* são mais elípticas. Bioquimicamente as leveduras também apresentam diferenças, sendo a mais conhecida a capacidade de apenas *C. gattii* crescer em agar canavanina-glicina-azul de bromotimol (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

As leveduras de *C. neoformans* e *C. gattii* podem ser classificadas quanto ao sorotipo em A, B, C, D e AD, os quais resultam de diferenças estruturais na cápsula polissacarídica. A princípio, *C. neoformans* var. *neoformans* era composto pelos sorotipos A, D e AD e *C. neoformans* var. *gattii* pelos sorotipos B e C (KWON-CHUNG; POLACHECK; BENNETT, 1982). Após descrição da nova variedade por Franzot, Salkin e Casadevall (1999), o sorotipo A passou a corresponder à *C. neoformans* var. *grubii* e os sorotipos D e AD à *C. neoformans* var. *neoformans*. Posteriormente, Kwon-Chung et al. (2004) atribuíram a *C. neoformans* var. *gattii* grau de espécie, passando a ser denominado *C. gattii* devido às diferenças clínicas e moleculares (WILSON; BENNETT; BALLEY, 1968; BENNETT; KWON-CHUNG; THEODORE; 1978; IKEDA et al., 1982; CHERNIAK; SUNDSTROM, 1994; LIN; HEITMAN, 2006).

A levedura conforme local de isolamento é classificada como de origem clínica ou ambiental. Nas Américas Central e do Sul já foram isoladas 10.548 leveduras, sendo 81 % dos isolados clínicos e 19 % ambientais. O gráfico com as porcentagens de isolados clínicos e ambientais, e o mapa com a distribuição geográfica dos isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans* e *C. gattii* encontram-se na Figura 1 (COGLIATI, 2013).

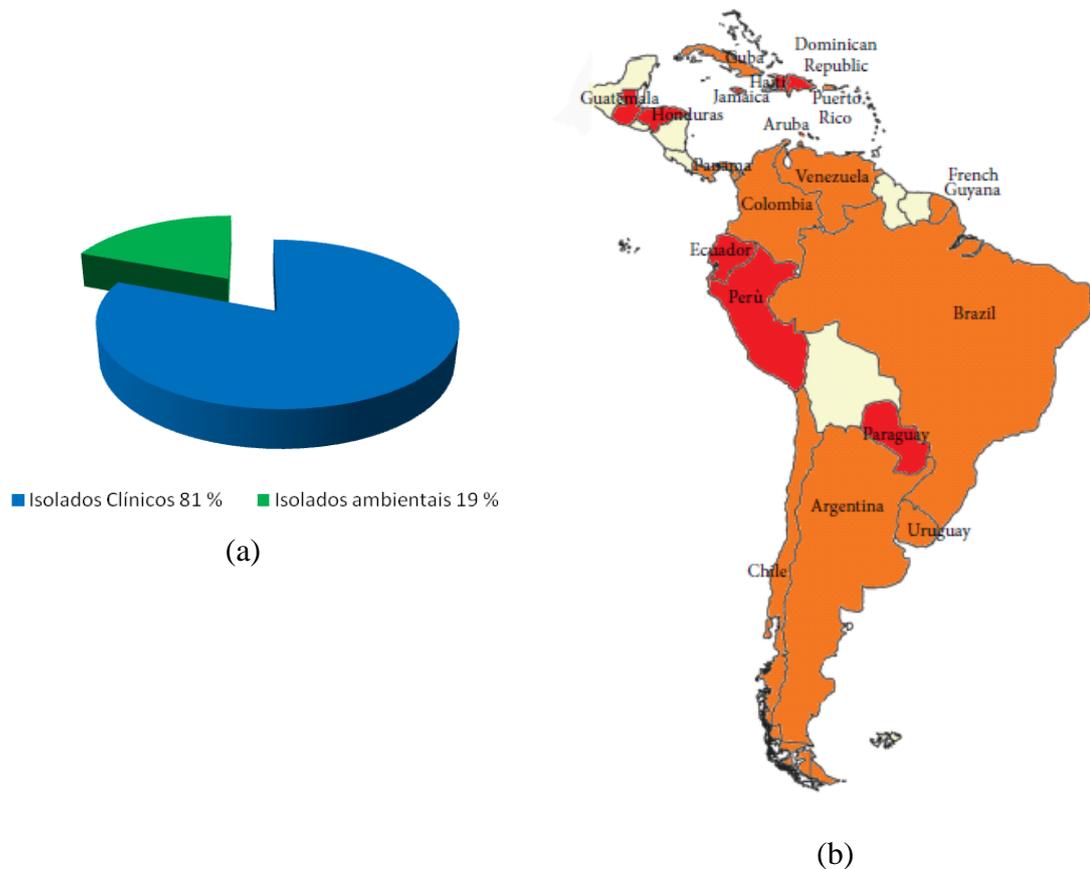


Fig. 1 Porcentagens dos isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* de origem clínica (n = 8.590) e ambiental (n = 1.958) (a). Mapa da distribuição geográfica das leveduras nas Américas Central e do Sul. Os isolados clínicos foram descritos nos países em vermelho e os isolados clínicos e ambientais foram descritos nos países em laranja (b) (COGLIATI, 2013).

A classificação mais recente é baseada em tipos moleculares após caracterização dos isolados por meio de técnicas de biologia molecular que levou a subdivisão das leveduras em pelo menos nove tipos moleculares distintos conforme observado na Figura 2 (LIN; HEITMAN, 2006). No Brasil, 1.439 leveduras de *Cryptococcus* spp. já foram reclassificadas e quase todos os tipos moleculares foram encontrados (exceto o tipo VGIV). A maioria dos isolados pertence ao tipo VNI (71,8 %), seguido pelo tipo VGII (18,5 %) e os demais tipos moleculares juntos correspondem a 9,7 % do total de isolados (COGLIATI, 2013).

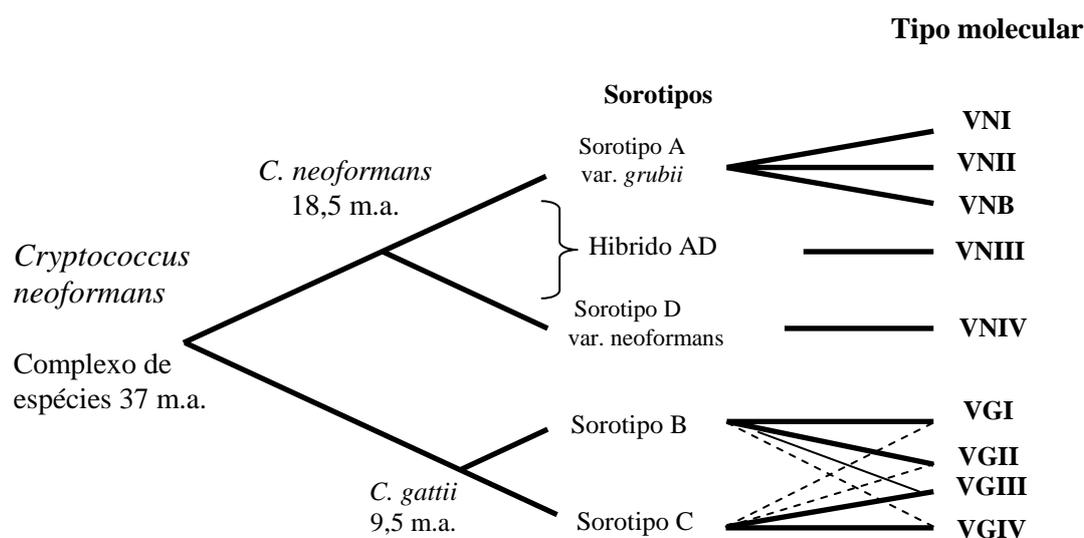


Fig. 2 Evolução das espécies do complexo de *C. neoformans* que originou a classificação baseada em tipos moleculares. O complexo contém pelo menos duas subespécies, *C. neoformans* e *C. gattii*, que divergiram de um ancestral comum a aproximadamente 37 e 18,5 m. a., respectivamente. Estes foram posteriormente divididos em quatro sorotipos consistindo em pelo menos nove tipos moleculares. A prevalência dos sorotipos em cada tipo molecular está expressa através da linha: sólida - alta, fina - intermediária e tracejada - baixa (LIN; HEITMAN, 2006). m.a. – milhões de anos.

3.3 *Cryptococcus* de importância clínica e origem da infecção

As leveduras do gênero *Cryptococcus* de importância clínica são *C. neoformans*, *C. gattii* e as espécies não-*neoformans*: *C. uniguttulatus*, *C. humicolus*, *C. albidus*, *C. laurentii* e *C. curvatus* (JOHNSON, et al 1998; MATTSSON, et al 1999; McCURDY; MORROW, 2001; MICELI; DÍAZ; LEE, 2011; KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). *Cryptococcus albidus* e *C. laurentii* são responsáveis por cerca de 80 % das infecções causadas por espécies não-*neoformans* (MICELI; DÍAZ; LEE, 2011).

Uma característica das leveduras do gênero *Cryptococcus* que pode ser indício da forma de origem da infecção é a capacidade das mesmas de permanecerem viáveis, por anos, em excrementos secos de pombos, considerados reservatórios de partículas infectantes, que podem ser inaladas por apresentarem cápsula reduzida e, assim atingir os alvéolos pulmonares (BARONI et al., 2006; ROSARIO, ACOSTA, COLOM, 2008). Os propágulos da levedura

também podem ser encontrados na natureza em solos altamente nitrogenados, tais como em locais onde há acúmulo de fezes de pombos, folhas, flores e madeira em decomposição (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; BARONI et al., 2006). Porém, não há consenso se a infecção origina-se pela inalação das leveduras ou dos basidiósporos espalhados pelo ar (LACAZ, 2002). Lin e Heitman (2006) publicaram trabalho sobre a biologia das espécies do complexo “*Cryptococcus neoformans*” e propuseram tanto os esporos quanto as leveduras dessecadas como causadoras das infecções (FIGURA 3).

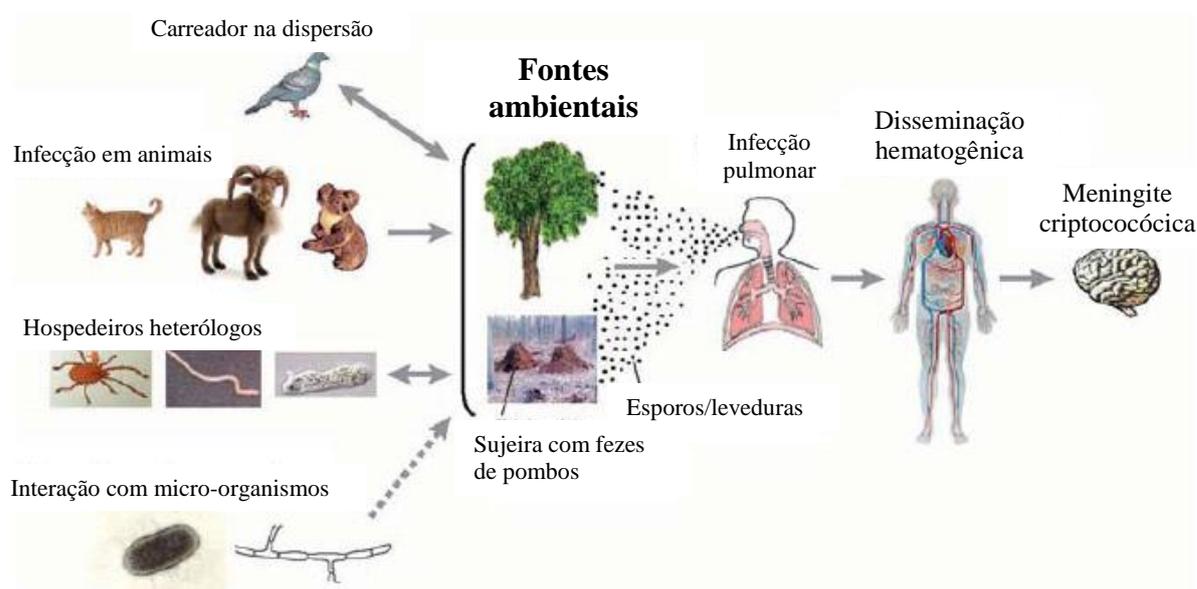


Fig. 3 Ciclo infeccioso de *C. neoformans*. A levedura sobrevive no meio ambiente em solo (contaminado com dejetos de aves) e em árvores. As aves, especialmente os pombos tem sido responsáveis pela dispersão mundial. As leveduras infectam animais como gatos, cabras e coalas; sobrevivem em predadores como insetos, minhocas e amebas; e interagem com outros micro-organismos como bactérias e fungos. As diferentes fontes ambientais podem originar a infecção pulmonar humana pela inalação dos esporos e/ou leveduras dessecadas. Quando o hospedeiro torna-se imunocomprometido, a levedura pode deixar o estado de latência e invadir o SNC que é a forma mais grave da criptococose humana (LIN; HEITMAN, 2006).

Ainda com relação à origem da infecção, Velagapudi et al. (2009) estudaram detalhadamente a morfologia e a fisiologia dos esporos de *C. neoformans*, e constataram a capacidade dos mesmos de provocar infecção e disseminar para diferentes tecidos em modelos murino e do invertebrado *Galleria mellonella*, porém não foi observada diferença

significativa de virulência quando comparado as leveduras. Estudos mostrando indícios sobre qual das estruturas fúngicas pode estar mais relacionada com a origem das infecções foram realizados por Botts e Hull (2010) que avaliaram comparativamente esporos e leveduras de *Cryptococcus*, e constataram que o esporo apresenta vantagens como agente infeccioso frente à levedura por apresentar tamanho entre 1-2 μm (menor que a levedura e favorece a dispersão no ambiente), causar morte em modelo murino semelhante à levedura (mesmo quando a carga infectiva inicial é menor), e por possuir cobertura externa espessa que confere resistência às condições ambientais adversas.

As leveduras também podem ser transmitidas via transplante de órgãos, sendo a criptococose a terceira infecção fúngica mais comum dentre os pacientes receptores de órgãos sólidos (HUSAIN; WAGENER; SINGH, 2001; SHOHAM; MARR, 2012). Como exemplos desta via de transmissão têm-se o relato do caso de criptococose cutânea (manifestação inicial da doença disseminada) em paciente após transplante renal (VÁSQUEZ et al., 2008); e também o caso onde o doador foi considerado neurologicamente normal, porém era portador da levedura, e originou diferentes manifestações da criptococose nos pacientes transplantados, tais como criptococemia, pneumonia criptocócica e meningoencefalite (BADDLEY et al., 2011).

3.4 Criptococose

A criptococose é causada pelas leveduras que compõem o complexo *C. neoformans* no qual já foram incluídas mais de 38 espécies de leveduras. As duas espécies patogênicas mais importantes clinicamente são *C. neoformans* e *C. gattii* (ROSARIO; ACOSTA; COLOM, 2008; KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

A doença tornou-se mais frequente e grave após a epidemia da SIDA, ela acomete entre 5-10% dos pacientes soropositivos e por isso tem-se destacado dentre as infecções fúngicas oportunistas (JABBOUR et al., 1996; HELLOU et al., 1999; LIN; HEITMAN, 2006; BRASIL, 2010). A infecção também pode atingir pacientes imunocompetentes onde frequentemente é causada por leveduras de *C. gattii* (MITCHELL; PERFECT, 1995; ZHU et al., 2002; KOKTURK et al., 2005; BARBOSA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007; CHEN et al., 2008; BRASIL, 2010; CHEN et al., 2012; LI et al., 2012; ROLSTON, 2013).

A criptococose pode manifestar-se de duas formas: cutânea e sistêmica. A forma cutânea representa 10% a 15% dos casos, que na maioria das vezes precede a forma sistêmica,

e caracteriza-se por lesões acneiformes, *rash* cutâneo, ulcerações ou massas subcutâneas que simulam tumores. A forma sistêmica apresenta manifestações que podem variar de lesões pulmonares assintomáticas até infecção disseminada grave do sistema nervoso central, devido ao neurotropismo da levedura, que causa meningoencefalites (meningite subaguda ou crônica) cujos sintomas são febre, fraqueza, dor no peito, rigidez na nuca, dor de cabeça, náusea, vômito, sudorese noturna, confusão mental e alterações de visão. Pode haver também comprometimento ocular, ósseo e, às vezes, da próstata. Os quadros graves da doença também podem acontecer devido à demora no diagnóstico inicial que é muitas vezes acompanhado de falhas do tratamento quimioterápico (BARKER, 1976; MITCHELL; PERFECT, 1995; CASADEVALL; PERFECT, 1998; FERNANDES et al., 2000; SEVERO et al., 2009; NUCCI, PERFECT, 2008; JARVIS et al., 2010; BRASIL, 2010).

Os estudos realizados com os isolados de *Cryptococcus* spp. tem revelado a existência de diferentes níveis de virulência, e tais diferenças podem estar relacionadas à capacidade da levedura de produzir e expressar múltiplos fatores associados à virulência, tais como a cápsula, melanina, produção de metabólitos e enzimas, que assim justificariam os diferentes comportamentos da doença (STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003; BOVERS; HAGEN; BOEKHOUT, 2008; KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). Como exemplos do comportamento diferenciado da doença podem ser citados os casos de criptococose causados por *C. gattii* em Vancouver no Canadá, provocados por isolados com elevada virulência, surgidos por recombinação na natureza, que atingiu habitantes e viajantes imunocompetentes, e estão envolvidas no primeiro surto comunicado de transmissão intercontinental de criptococose (HOANG et al., 2004; FRASER et al., 2005; LINDBERG et al., 2007; KANAFANI; PERFECT, 2008).

3.5 Epidemiologia

A doença é cosmopolita, geralmente acomete adultos, e é duas vezes mais frequente no gênero masculino, mas pode ocorrer em animais como gatos, cavalos, vacas, touros, ovelhas, cabras, golfinhos, leopardos e psitacídeos. (LACAZ, 2002; BRASIL, 2010; MASCARENHAS-BATISTA, SOUZA, SACRAMENTO, 2013; COGLIATI, 2013).

A taxa de incidência mundial de meningite criptococócica dentre os portadores de SIDA varia entre 0,04 a 12 %. Segundo a UNAIDS ('Joint United Nations Program on HIV/AIDS' - programa das Nações Unidas contra HIV/SIDA), globalmente cerca de 34

milhões de pessoas tornaram-se soropositivas para HIV até o fim de 2011. Além disso, ocorreram cerca de 1,7 milhões de mortes relacionadas com a AIDS. A África sub-Saariana é a região mais afetada onde um a cada vinte adultos são portadores do HIV o que corresponde a 69 % do total de pessoas portadoras do vírus no mundo (UNAIDS, 2012). De acordo com o ‘Centers for Disease Control and Prevention’ (CDC), aproximadamente um milhão de novos casos de meningite criptocócica surge por ano e resultam em 625.000 mortes (CDC, 2013).

No Brasil do ano 2000 até 2012 foram notificados 446.318 casos de SIDA (BRASIL, 2012), e estima-se que dentre estes 5-10 % dos pacientes desenvolverão a criptococose (BRASIL, 2010). Um estudo retrospectivo de 696 casos de meningite criptocócica no estado do Rio de Janeiro entre 1994 e 2004 mostrou que 61,2% dos pacientes eram soropositivos para HIV, com taxa de letalidade de 51,8% (LEIMANN; KOIFMAN, 2008); Outro estudo retrospectivo foi realizado entre 2002 e 2008 com 50 pacientes diagnosticados com meningoencefalite criptocócica, admitidos no Hospital Couto Maia em Salvador (Bahia), onde os resultados indicaram que 70 % dos pacientes eram do sexo masculino, 90 % eram soropositivos para HIV e a taxa de mortalidade foi de 22 % (MASCARENHAS-BATISTA; SOUZA; SACRAMENTO, 2013).

Nguyen et al. (2010) relataram após estudo multicêntrico de 3 anos, que pacientes imunocompetentes com meningoencefalites tem prognóstico pior para a doença do que pacientes HIV positivos ou imunocomprometidos não-soropositivos para HIV. A literatura descreve que mais de 50 % dos pacientes com meningite criptocócica desenvolve hipertensão intracraniana, independente do estado imunológico, o que agrava o quadro clínico e dificulta o tratamento (GRAYBILL et al., 2000; BYRNES; MARR, 2011). Existem também relatos de criptococose cutânea entre 10 a 15 % dos pacientes com criptococose sistêmica e em pacientes portadores do HIV (BIVANCO; MACHADO; MARTINS, 2006; DINATO et al., 2006; NASSER; NASSER-FILHO; VIEIRA, 2011).

Os casos de criptococose em pacientes imunocompetentes já foram descritos por diversos autores (ROZENBAUM et al., 1994; LOPES et al., 1997; CORREA et al., 2002; LACAZ et al., 2002; BROMILOW; CORCORAN, 2007; OLIVEIRA et al., 2007; CHEN et al., 2008; SOARES et al., 2008; DUGGAL et al., 2008; LINDENBERG et al., 2008; FAVALESSA et al., 2009; NASSER; NASSER-FILHO; VIEIRA, 2011; CHEN et al., 2012; LI et al., 2012; MARQUES et al., 2012; MORA et al., 2012; BELLO et al., 2013). Existem relatos de casos raros de criptococose que acometeram crianças imunocompetentes no Brasil, que aconteceram nas cidades de Belém (PA) e de Porto Alegre (RS), onde foram registrados

no total 32 casos com mortalidade de 40,6% (SEVERO et al., 2009). Casos incomuns de criptococose após longo período de exposição às leveduras também foram descritos; e nestes a pneumonia criptocócica causada por *C. gattii* disseminou hematologicamente e originou meningoencefalite em duas ocasiões distintas: a primeira paciente, uma senhora Canadense de 45 anos desenvolveu a infecção 11 meses após contato com a levedura; e a segunda paciente, uma senhora Suíça de 53 anos apresentou os sintomas 13 meses após exposição às leveduras; as pacientes tinham em comum apenas o relato de viagem à ilha de Vancouver no Canadá (LEVY et al., 2007; GEORGI et al., 2009). Outro relato de caso raro de criptococose disseminada aconteceu na cidade de Nova York (EUA), com uma paciente de 29 anos, que por causa da infecção sofreu aborto espontâneo na 13ª semana de gestação (PASTAGIA; CAPLIVSKI, 2010).

Mais recentemente tem-se o relato do caso de pneumonia criptocócica causada por *C. gattii* em um homem imunocompetente de 56 anos, que faleceu dois anos após viagem à Colômbia onde adquiriu a levedura. O paciente foi tratado inicialmente com penicilina para a suspeita de pneumonia bacteriana, e 15 dias após internação foi diagnosticado com criptococose disseminada. O tratamento com antifúngico iniciou-se com anfotericina B intravenosa (AMB) associada ao fluconazol oral que durou aproximadamente dois meses, e causaram lesões renais e auditivas; o paciente também ficou cego devido à hipertensão craniana e houve piora do quadro clínico. Os antifúngicos foram trocados para AMB lipossomal (administrada por três meses) associada ao voriconazol. Também foi administrada a imunoterapia com interferon gama por dois meses, porém nenhum tratamento obteve êxito (ILLNAIT-ZARAGOZÍ et al., 2013).

Como epidemiologia das infecções no Brasil, Rozembaum e Gonçalves (1994) propuseram *C. neoformans* como cosmopolita, e *C. gattii* como tipicamente de regiões tropicais e subtropicais, podendo ser considerado endêmico na região nordeste, contudo tal endemismo não pode ser afirmado, pois casos de criptococose em pacientes imunocompetentes também foram descritos no Rio Grande do Sul, região de clima temperado (CLAUSELL, 1949; LOPES et al., 1997). Leveduras das duas espécies também foram isoladas na região sul do Brasil em excretas de aves do Jardim Zoológico, como também em árvores nativas na cidade de Resistência, região nordeste da Argentina (ABEGG et al., 2006; CATTANA et al., 2013). Assim, as infecções que ocorrem no Brasil podem ser causadas pelas duas espécies da levedura, embora haja predominância do sorotipo A, seguida de menor prevalência dos sorotipos B e D (LACAZ, 2002). Ainda no Brasil, Lindenberg et al. (2008)

realizaram estudo prospectivo entre os anos de 1995-2005 no Hospital Universitário da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, e constataram que 10,6 % dos 123 pacientes com criptococose eram imunocompetentes. Favallessa et al. (2009) encontraram 10 isolados de *Cryptococcus* (5 de *C. neoformans* e 5 de *C. gattii*) em pacientes imunocompetentes no estado do Mato Grosso.

A presença das leveduras de *Cryptococcus* em locais de clima temperado também foi confirmada pelos surtos de infecções provocados pelos isolados de *C. gattii* encontrados na ilha de Vancouver (Columbia Britânica, Canadá), na região noroeste dos Estados Unidos e na Europa onde estima-se que, entre 5 e 30 % dos casos de criptococose sejam causadas por leveduras de *C. neoformans* sorotipo AD, sendo tal dado subestimado pelas limitações das técnicas de sorotipagem (COGLIATI et al., 2001; KIDD et al., 2004; VIVIANI et al., 2006; MacDOUGALL et al., 2007; UPTON et al., 2007; BOVERS et al., 2008; LIN et al., 2008; CANNON et al., 2009; LOCKHART; HARRIS, 2010; BYRNES; MARR, 2011).

As informações epidemiológicas sobre as leveduras de *Cryptococcus* spp. descritas nas Américas Central e do Sul indicam que mais da metade foram isoladas no Brasil (53 %), seguido pela Colômbia (22 %) e Argentina (15 %) conforme disposto no gráfico da Figura 4 (COGLIATI, 2013).

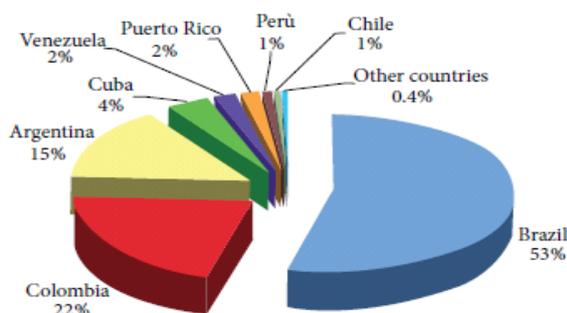


Fig. 4 Distribuição em porcentagens dos isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* de origem clínica (n = 8.590) e ambiental (n = 1.958) nos diferentes países das Américas Central e do Sul (COGLIATI, 2013).

3.6 Tratamentos

As doenças infecciosas encontram-se em segundo lugar dentre as principais causas de morte em todo mundo, e nos países desenvolvidos está na terceira posição (NATHAN, 2004). Os tratamentos das infecções sistêmicas de origem fúngica são um dos principais problemas

dentro do campo da micologia médica, por que são complexas e de difícil resolução (SAAG et al., 1992; SAAG et al., 2000; RUIZ-CAMPS; CUENCA-ESTRELLA, 2009).

Atualmente, o tratamento da criptococose causada por *C. neoformans* e *C. gattii* são muito semelhantes, e as recomendações são baseadas no estado imunológico do paciente (HIV positivo ou HIV negativo), o (s) órgão (s) acometido (s) (pulmões e/ou SNC); e incluem o uso de agentes antifúngicos (azóis, polienos e análogos de nucleosídeos), drenagem do fluído cérebro espinhal e ocasionalmente ressecção cirúrgica (SAAG et al., 2000; HUSTON; MODY, 2009).

No Brasil, o tratamento recomendado depende da forma clínica (cutânea ou sistêmica). O esquema terapêutico de primeira escolha para o tratamento da criptococose sistêmica ou disseminada é com anfotericina B (AMB), na forma de desoxicolato ou formulação lipídica por 6 semanas na fase aguda da doença, seguido de fluconazol na fase de consolidação (BRASIL, 2010). A AMB deve ser aplicada por infusão lenta endovenosa em ambiente hospitalar com monitoramento dos efeitos adversos e das funções hepáticas e renais (MARTINEZ, 2006). Nas formas exclusivamente pulmonares ou com sintomas clínicos leves, é indicado fluconazol por 6 a 12 meses ou itraconazol durante 6 a 12 meses (BRASIL, 2010).

A AMB pertence à classe dos polienos e apresenta estrutura macrocíclica (FIGURA 5). Esta possui efeito fungicida porque liga-se ao ergosterol da membrana fúngica, alterando sua permeabilidade, e assim, favorece a perda de constituintes citoplasmáticos. Além disso, a AMB promove lesões oxidativas que alteram o metabolismo e prejudicam a sobrevivência da levedura.

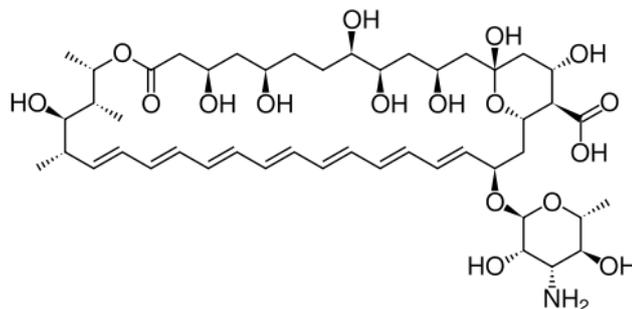


Fig. 5 Estrutura química da anfotericina B (<http://www.drugs.com/pro/amphotericin-b.html>).

Os efeitos adversos causados pela AMB devem-se ao fato de também ligar-se ao colesterol das membranas celulares humanas causando reações adversas imediatas devido à liberação de interleucinas e prostaglandinas que provocam febre, calafrios, taquicardia,

hipertensão arterial, náuseas, vômitos e taquipnéia. Os efeitos adversos tardios dependem da dose acumulada de AMB, da sensibilidade e condições orgânicas do paciente, sendo mais comuns e graves a nefrotoxicidade e a anemia. Outras reações são plaquetopenia, dispnéia, hipotensão arterial, arritmia cardíaca, toxicidade neurológica e tromboflebite no local da aplicação (MARTINEZ, 2006).

Os azóis apresentam em sua estrutura um anel pentagonal com três átomos de carbono e dois de nitrogênio (imidazólicos), ou anel com dois átomos de carbono e três de nitrogênio (triazólicos - FIGURA 6).

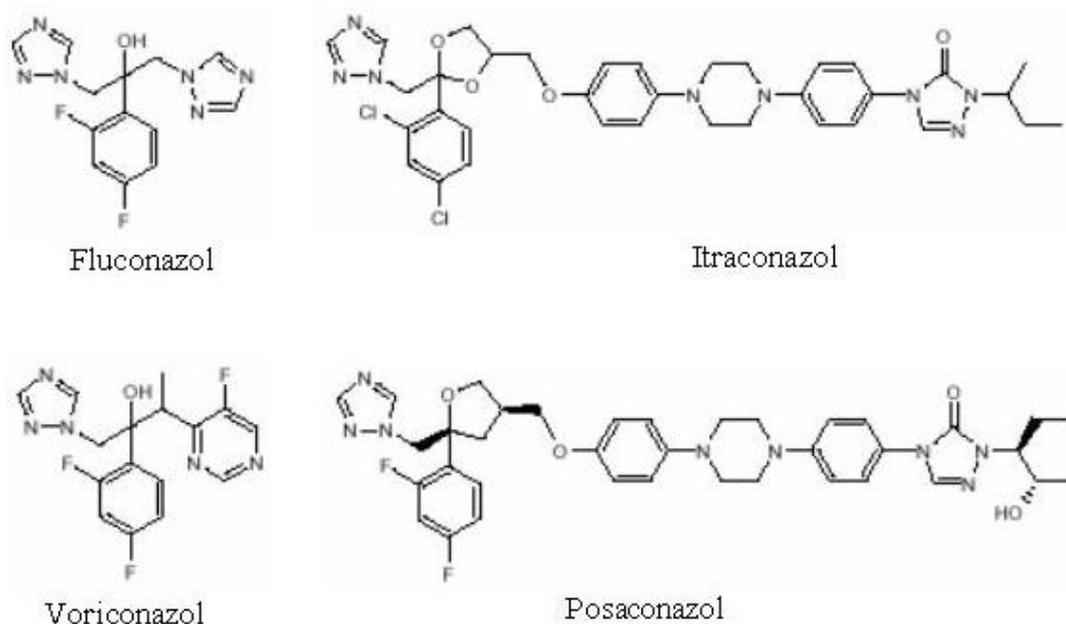


Fig. 6 Estruturas químicas dos antifúngicos triazólicos: fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol (<http://www.visaoacademica.ufpr.br>).

No tratamento da doença é mais comum o emprego de alguns fármacos do subgrupo triazólicos (fluconazol, itraconazol e voriconazol) que agem sobre enzimas do citocromo P 450 dos fungos e, bloqueiam a demetilação do lanosterol e a síntese de ergosterol. O efeito final é a modificação da permeabilidade da membrana e da viabilidade fúngica. Estes antifúngicos também alteram a síntese de lipídeos e inativam enzimas do processo oxidativo da levedura. Os principais efeitos colaterais são intolerância gastrointestinal, hepatotoxicidade e hipersensibilidade. Os azóis são substâncias teratogênicas e não devem ser administradas a mulheres grávidas. O voriconazol apresenta como efeitos colaterais, além dos comuns aos

azólicos, distúrbios visuais como percepção de cores alterada, visão borrada e fotofobia na primeira semana de tratamento (MARTINEZ, 2006; PASQUALOTTO; DENNING, 2008).

No geral, o número de fármacos antifúngicos liberados para o tratamento da criptococose com recomendação pelos órgãos internacionais ainda é limitada. Contudo, é consenso que a escolha do melhor tratamento está associada, principalmente, a causa da imunossupressão e ao local de instalação da infecção. Os trabalhos publicados por Mitchell e Perfect (1995); Saag et al. (2000); Johnson e Perfect (2007) e Perfect et al. (2010) sugerem que a opção de tratamento que combina anfotericina B e 5-fluorocitosina vem apresentando os melhores resultados, mesmo para pacientes com SIDA. A Sociedade Espanhola recomenda as formulações lipídicas de AMB associada a 5-fluorocitosina, seguido de manutenção com fluconazol como esquema de tratamento para candidíase invasiva e outras infecções por leveduras, especialmente para os pacientes submetidos a transplante de órgão sólido com criptococose pulmonar, no SNC ou com a doença disseminada. Esta última associação de antifúngicos também são utilizados para crianças, fazendo apenas ajuste da dosagem (AGUADO et al., 2011).

Um guia para tratamento da meningoencefalite criptocócica foi publicado por Perfect et al. (2010) no qual os autores descreveram a importância da divisão dos pacientes em três grupos de risco: (1) pacientes infectados com HIV, (2) transplantados e (3) pacientes não-infectados com HIV ou não-transplantados; e ressaltaram existir também recomendações especiais para pacientes gestantes, crianças, pacientes de locais com recursos limitados e àqueles com infecções por *C. gattii*. O tratamento é baseado em três princípios-chave: (a) terapia fungicida com polienos e flucitosina seguido de regime supressor com fluconazol, (b) a importância do reconhecimento precoce e tratamento da hipertensão intracraniana e/ou da síndrome inflamatória após reconstituição do sistema imunológico e (c) emprego de formulações lipídicas da anfotericina B em pacientes com problemas renais.

A adição de citocinas, tais como IFN- γ recombinante, ao regime de tratamento padrão para pacientes com infecção persistente, ou a indução da imunização com vacina (com glicoantígenos de *C. neoformans*) e a radioimunoterapia tem-se destacado como alternativa para tratamento de infecções persistentes em pacientes com infecções mais graves e são terapias recomendadas pela Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (BRYAN et al., 2010; PERFECT et al., 2010; HUANG et al., 2010; ANTACHOPOULOS; WALSH, 2012).

Embora exista tratamento para a criptococose, a necessidade da busca de novos fármacos dá-se pelo fato de ser limitada a quantidade de substâncias antifúngicas disponíveis

e por apresentarem efeitos colaterais graves. Como o diagnóstico inicial da doença é difícil e muitas vezes demorado, um novo antifúngico mais eficaz e sem as complicações dos fármacos empregados atualmente, colaboraria para que não houvessem elevados índices de falha terapêutica, evitaria o desenvolvimento das sequelas neurológicas graves e poderia reduzir as taxas de óbito dos pacientes (NUCCI, PERFECT, 2008; JARVIS et al., 2010).

3.7 Resistência e/ou tolerância aos antifúngicos por *Cryptococcus* spp.

A resistência aos antifúngicos das espécies de *Cryptococcus* é um fato complexo, pois envolve aspectos inerentes às leveduras, além de características do paciente e do tipo de tratamento adotado no combate à infecção primária. As leveduras resistentes, a despeito das substâncias disponíveis para o tratamento das infecções, contribuem para as elevadas taxas de falência dos mesmos. O surgimento da resistência e/ou tolerância pode acontecer pelo não seguimento ao tratamento devido à intolerância à medicação, por complicações clínicas secundárias, fatores farmacocinéticos e desenvolvimento de resistência primária ou secundária aos antifúngicos (PERFECT; COX, 1999; PEREA; PATTERSON, 2002).

A complexidade da resistência também está ligada à inexistência de um ponto de corte bem definido para mesma, devido ao número restrito de estudos relacionando sensibilidade/resistência e resposta clínica (PEREA; PATTERSON, 2002).

A resistência intrínseca a 5-fluorocitosina (anterior ao tratamento) pode ser observada em cerca de 2 % dos isolados de *C. neoformans* (BOSSCHE et al., 1994). A monoterapia com 5-fluorocitosina em pacientes com meningite criptocócica promove o surgimento de resistência entre 20-30% dos isolados (POLAK; HARTMAN, 1991; BOSSCHE, 1997). Li et al. (2012) após estudo com 61 isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. (52 de *C. neoformans* e 9 de *C. gattii*) relataram que os isolados clínicos de pacientes com SIDA foram tolerantes ao fluconazol e a 5-fluorocitosina, e sugeriram que o uso da AMB pode levar a tolerância ou resistência da levedura com o passar do tempo. A tolerância à AMB também foi observada em 7 isolados de *Cryptococcus* obtidos de pacientes submetidos à terapia antifúngica com AMB (PAPPALARDO et al., 2009). Nos ensaios as leveduras foram submetidas à concentração de 1,0 µg/mL (semelhante à concentração sérica) por diferentes intervalos de tempo (6, 12, 24 e 48 h) e as leveduras viáveis, ou seja tolerantes, foram capazes de crescer após término do ensaio fungicida.

Estudos mais detalhados sobre a resistência e seus mecanismos estão em desenvolvimento. O conhecimento sobre a ocorrência da resistência algumas vezes é proveniente de observações clínicas após terapia de manutenção prolongada com o fluconazol e o itraconazol e, alguns estudos, propõem que os mecanismos de resistência abrangem tanto mutações no alvo, quanto aumento no efluxo dos antifúngicos (PEETERMANS et al., 1993; BIRLEY et al., 1995; BOSSCHE, 1994; VENKATESWARLU et al., 1997; DAVEY et al., 1998; CANNON et al., 2009).

A resistência cruzada já foi observada em isolados clínicos nos quais os pacientes foram tratados com anfotericina B ou fluconazol. Uma das hipóteses para o aparecimento da resistência cruzada é a redução dos níveis de ergosterol da membrana fúngica (VENKATESWARLU et al., 1997; CANNON et al., 2009) e a expressão de bombas de efluxo do antifúngico pela levedura (JOSEPH-HORNE et al., 1995).

3.7.1 Resistência aos antifúngicos por *C. neoformans*

Programas de vigilância e estudos sobre a resistência aos antifúngicos com espécies de *Cryptococcus* ainda são poucos e limitados. Na literatura tem-se o estudo abordando os antifúngicos mais comuns utilizados na terapêutica da criptococose, realizado nos Estados Unidos e no Reino Unido entre os anos de 1990 e 2004, que indica pouco aumento da resistência nestes países. Porém, em outras partes do mundo existem relatos de aumento da resistência aos antifúngicos, como também a descrição de elevadas taxas de persistência fúngica, casos de reincidências das infecções e surgimento de isolados com maior virulência que têm sinalizado o surgimento de isolados de *C. neoformans* com potente resistência aos antifúngicos disponíveis (BERG; CLANCY; NGUYEN, 1998; BRANDT; PFALLER; HAJJEK, 2001; PERKINS et al. 2005; PFALLER et al., 2005; KANAFANI; PERFECT, 2008).

Os casos de resistência que despertam atenção são embasados em relatos clínicos, ou decorrentes de estudos em grupos com poucos indivíduos que apresentaram infecções graves e/ou de difícil tratamento, que muitas vezes, levam parte ou maioria dos pacientes à morte. Como exemplo, tem-se o relato clínico de Ecevit et al. (2006), no qual foram descritos nove casos raros de criptococose no SNC por *C. neoformans* var. *grubii* em pacientes imunocompetentes. A importância desses casos deve-se ao fato de que tais infecções ocorrem normalmente por *C. gattii* e não por *C. neoformans* var. *grubii*. Ainda no trabalho foram

relatados: menor resposta terapêutica ao tratamento com fluconazol, agravamento da infecção pela demora no diagnóstico e/ou características das leveduras, sequelas neurológicas graves nos sobreviventes e óbito de quase metade dos pacientes.

No Brasil, em estudo realizado no hospital universitário da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, foram descritos dois isolados de *C. neoformans* resistentes ao itraconazol com CIM de 1,0 µg/mL (SILVA et al., 2008); No estado do Mato Grosso foram encontrados dois isolados de *C. neoformans* resistentes ao fluconazol e ao itraconazol, e outros dois isolados com perfil sensível dose dependente ao fluconazol (FAVALESSA et al., 2009).

O início do surgimento de resistência ao fluconazol devido ao aumento significativo das CIM 50 e 90 foi descrito por Sar et al. (2004). Há relatos também de que os pacientes HIV positivos submetidos a terapia prolongada de manutenção com o fluconazol já apresentaram: infecções causadas por leveduras com menor sensibilidade *in vitro* ao fluconazol, 50% de resistência ao itraconazol e resistência ao fluconazol (PERKINS et al., 2005; BIRLEY et al., 1995; JOHNSON 2008).

Um estudo com isolados clínicos de *C. neoformans*, obtidos de pacientes com infecções recidivantes, mostrou a presença de diferentes níveis de sensibilidade ao fluconazol, sendo um isolado resistente ($CIM \geq 64 \mu\text{g/mL}^{-1}$) e três sensíveis dependente da dose (S-DD com CIM entre 16 e $32 \mu\text{g/mL}^{-1}$). Outro fato interessante relatado foi a mudança da sensibilidade de uma levedura que se tornou S-DD frente ao fluconazol com passar do tempo (ARECHAVALA et al., 2009).

A resistência à 5-fluorocitosina é encontrada em aproximadamente 2 % dos isolados de *C. neoformans* (BRANDT; PFALLER; HAJJEK, 2001). Contudo, o aparecimento de resistência a 5-fluorocitosina é comum após ser utilizada como monoterapia na infecção (HOSPENTHAL; BENNETT, 1998; SCHWARZ et al., 2006).

Como exemplos de descrição de isolados resistentes a AMB temos o trabalho de Lozano-Chiu et al. (1998) que detectaram e confirmaram resistência em 3 dos 10 isolados de *C. neoformans* estudados; neste, os autores utilizaram dois meios de cultura (RPMI 1640 e Meio antibiótico n° 3) e duas metodologias diferentes (E-test® e M27-A). O trabalho de Silva et al. (2008) realizado no Brasil descreveu um isolado resistente à AMB com CIM de 2,0 µg/mL.

Diversos autores relatam que ainda há pouco conhecimento sobre o mecanismo de resistência aos polienos (AMB), contudo, estudos com isolados de *Candida* e *Cryptococcus*, com intuito de desvendar o mecanismo de resistência, mostraram que estas apresentavam

alterações no gene ERG3 e, conseqüentemente, redução no conteúdo de ergosterol e acúmulo de outros esteróis na membrana que podem justificar tal característica (KANAFANI; PERFECT, 2008; ESPINEL-INGROFF, 2008).

3.7.2 Resistência aos antifúngicos por *C.gattii*

A resistência aos antifúngicos por *C. gattii* já foi descrita em pacientes acometidos por infecções com tratamentos de elevadíssima complexidade ou no qual a resposta de cura foi diferente ou insuficiente em relação aos tratamentos convencionais (CHATURVEDI; CHATURVEDI, 2011). A capacidade das leveduras de *C. gattii* de causar infecções mais graves e apresentar comportamento diferenciado foi descrito por Yee-Chun et al. (2000). No trabalho os autores observaram que os isolados de *C. gattii* eram mais resistentes em comparação aos isolados de *C. neoformans* frente a 5-fluorocitosina e AMB.

No Brasil, a resistência de *C. gattii* foi descrita por diversos autores (TRILLES et al., 2004; SILAVA et al., 2008; FAVALESSA et al., 2009). Trilles et al. (2004) observaram que 57 isolados de *C. gattii* estudados foram mais resistentes que os isolados de *C. neoformans* aos antifúngicos albaconazol, itraconazol, fluconazol, micafungina, cetoconazol, ravuconazol e voriconazol. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as espécies ao se comparar os valores obtidos de CIMs para AMB e 5-fluorocitosina. Silva et al. (2008) também descreveram o isolamento de dois isolados de *C. gattii* resistentes, um ao itraconazol (CIM de $1,0 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) e outro à AMB (CIM de $2,0 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) que também apresentou CIM elevada ao fluconazol ($16 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$). Favalessa et al. (2009) também encontraram um isolado de *C. gattii* sensível dose dependente e um outro resistente ao fluconazol.

Isolados de *C. neoformans* sorotipo A (n= 117) e de *C. gattii* sorotipo B (n= 65) de origem ambiental também apresentaram resistência. Neste estudo, constatou-se que os isolados de *C. gattii* foram mais resistentes do que os de *C. neoformans* frente aos antifúngicos AMB, fluconazol, itraconazol, cetoconazol e voriconazol por comparação das médias geométricas dos valores de CIMs obtidos (KHAN et al., 2007).

3.8 Importância dos micro-organismos endofíticos

Os micro-organismos endofíticos foram descobertos na Alemanha em 1904, e desde então, diferentes definições surgiram dependendo de como foram isolados e examinados

(STROBEL; DAISY, 2003). O termo endofítico, na literatura científica, já encontra-se bem estabelecido desde a demonstração da produção de alcalóides por fungos endofíticos, em 1970, através de estudos realizados nos Estados Unidos e na Nova Zelândia (SAIKKONEN et al., 2004; FIRÁKOVÁ; ŠTURDÍKOVA; MÚČKOVÁ, 2007).

Em 1992, Petrini et al. definiram que micro-organismos endofíticos são todos aqueles que durante pelo menos uma fase de seu ciclo de vida, colonizam assintomaticamente o interior dos tecidos vivos de seus hospedeiros. Assim, pela definição, os endofíticos não são apenas os fungos filamentosos, mas sim uma ampla variedade de organismos, incluindo leveduras e bactérias (CHANWAY, 1996; FERNANDES, 2008), protistas (PETERS, 1991), e insetos (FELLER, 1995). Uma nova definição foi proposta por Bacon e White (2000), onde são considerados micro-organismos endofíticos, todos aqueles que, pelo menos durante parte do seu ciclo de vida, habitam tecidos vegetais vivos sem causar sintomas aparentes de doença ou efeitos negativos a seus hospedeiros. E os estudos de Li et al. (2007) mostraram que os fungos endofíticos (FE) são ubíquos nas plantas e possuem relações mutualísticas com seu hospedeiro. A presença dos endofíticos, geralmente beneficia a planta hospedeira ajudando em seu desenvolvimento e defesa. Além disso, estes são potenciais fontes de metabólitos secundários que atuam regulando as plantas vizinhas da comunidade e seus herbívoros. Contudo, pouco é conhecido sobre a fisiologia e regulação desta interação (GIMENEZ et al., 2007), como também sobre qual tamanho de sua diversidade, número de plantas hospedeiras e distribuição geográfica (ARNOLD; LUTZONI, 2007).

Os endofíticos como potenciais fontes de produtos naturais para emprego na medicina, agricultura e indústria ainda foram pouco estudados (STROBEL et al., 2004). Estima-se que a relação entre as plantas superiores e os endofíticos ocorre desde o surgimento das primeiras plantas a mais de 100 milhões de anos (STROBEL, 2003); e que as plantas superiores existentes, cerca de 300.000, sejam hospedeiras de um ou mais endofíticos (STROBEL et al., 2004).

A diversidade e o número de FE em plantas variam conforme a época do ano. Naik; Shashikala e Krishnamurthy (2008) descreveram que durante o inverno, o número de endofíticos, isolados de 15 plantas medicinais (arbustos) do sul da Índia, é maior do que nas demais épocas do ano daquela região.

Rakotoniriana et al. (2008) isolaram 45 espécies de fungos das folhas de *Centella asiática* (Apiaceae). Os autores constataram diferença na distribuição dos endofíticos na região foliar e a existência de interação entre os fungos, ou seja, foram observadas inibições

de crescimento, *in vitro*, entre os fungos isolados que justificaram as diferenças nas taxas de isolamento entre os grupos de endofíticos.

Micro-organismos endofíticos podem agir no controle biológico, inibindo e/ou matando patógenos de frutas. Substâncias voláteis, obtidas de *Muscodor albus*, demonstraram potencial no controle de pragas pós-colheita, uma vez que nos testes *in vitro* foram ativos contra os micro-organismos dos gêneros *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Geotrichum*, *Monilinia*, *Penicillium* e *Rhizopus* (MERCIER; JIMÉNEZ, 2004; FIRÁKOVÁ; ŠTURDÍKOVA; MÚČKOVÁ, 2007).

Os endofíticos podem ter aplicação industrial, pois podem produzir enzimas (peroxidases, lacases não específicas, xilanases, glucanase e enzimas termoestáveis para degradação de amido). Eles podem ser empregados na fitoremediação onde auxiliam na remoção de xenobióticos do solo e também em processos de biotransformação, onde produzem modificações químicas em substâncias que não são normalmente seus substratos, sendo assim utilizados na produção de novas substâncias (FIRÁKOVÁ; ŠTURDÍKOVA; MÚČKOVÁ, 2007; BORGES et al., 2007; PIMENTEL et al., 2011).

3.9 Fungos endofíticos e bioprospecção de substâncias

As fontes naturais são importantes para a busca e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, uma vez que já foram isoladas cerca de 23.000 substâncias ativas de micro-organismos (DEMAIN, 2013). Substâncias bioativas ou extratos padronizados de plantas têm potencial para contornar problemas como resistência aos antifúngicos, efeitos colaterais, toxicidade elevada e alto custo dos antifúngicos atuais (W.H.O., 2008).

Nos países em desenvolvimento, as comunidades indígenas entre outras são detentoras de conhecimentos sobre plantas medicinais e seus usos para tratamento de diversas doenças; e é a partir deste conhecimento que muitas vezes são descobertos novos compostos ativos ao se estudarem extratos de tais plantas para avaliar suas atividades biológicas (MOHANTA; TAYUNG; MOHAPATRA, 2008).

Porém, nos últimos anos, estudos dos fungos residentes nestas plantas (endofíticos) mostram que estes também produzem metabólitos similares ou mais ativos que as plantas hospedeiras (STROBEL, 2002; GUO et al., 2008). O interesse em estudar fungos endofitos vem aumentando nos últimos anos, e tem como principais objetivos:

i) esclarecer seu papel nas plantas e o seu envolvimento em processos de resistência a patógenos, pragas e estresses ambientais (AZEVEDO et al., 2000; ARNOLD et al., 2003; RUBINI et al., 2005; HERRE et al., 2007; RODRIGUEZ; REDMAN, 2008);

ii) avaliar seus potenciais como produtores de substâncias bioativas, com possível aproveitamento na agricultura e medicina (SCHULZ et al., 2002; STROBEL, 2002; CAMPOS et al., 2008; VERZA et al., 2009).

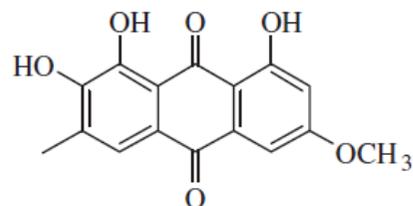
Portanto, uma vez que o número de substâncias com atividade antifúngica disponível é limitado, a bioprospecção de FE associados a plantas com emprego medicinal surge como estratégia válida na busca de novos fármacos. Além disso, estima-se que cerca de metade das substâncias bioativas isoladas de fungos endofíticos sejam desconhecidas (STROBEL, 2003; STROBEL; DAISY, 2003; FIRÁKOVÁ; ŠTURDÍKOVA; MÚČKOVÁ, 2007).

Dentre as substâncias produzidas pelos fungos endófitos, já foram encontradas substâncias com atividade antibacteriana, fungicida e herbicida (SCHULZ; BOYLE, 2005). Esses metabólitos pertencem a diversas classes químicas, incluindo alcalóides, flavonóides, fenilpropanóides, lignanas, peptídeos, esteróides, xantonas, compostos fenólicos, isocumarinas, quinonas, terpenóides, citocalasinas, compostos alifáticos e clorados (TAN; ZOU, 2001; SCHULZ; BOYLE, 2005).

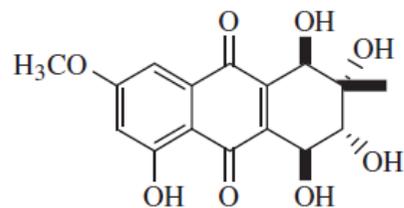
Exemplos de metabólitos secundários bioativos produzidos por micro-organismos endofíticos isolados de plantas com ou sem uso medicinal encontram-se listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Metabólitos secundários de micro-organismos endofíticos provenientes de espécies vegetais com atividade biológica de interesse médico nos últimos 6 anos (YU et al., 2010¹ e outras referências²).

Micro-organismo	Planta de origem	Metabólitos secundários	Atividades biológicas	Referência
<i>Ampelomyces</i> spp.	<i>Urospermum picroides</i>	Quinonas: 3-O-metil alaternina e altersolanol A	Antibacteriana: <i>S. aureus</i> , <i>S.epidermidis</i> e <i>Enterococcus faecalis</i>	Aly et al. (2008) ¹



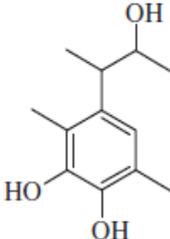
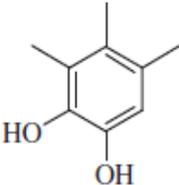
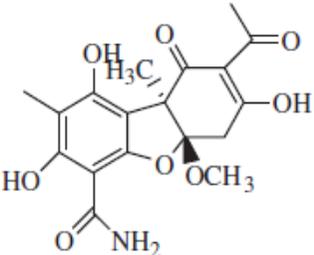
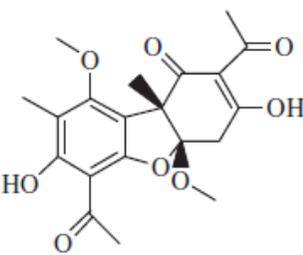
3-O-metil alaternina



Altersolanol A

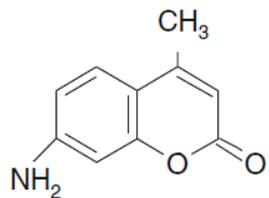
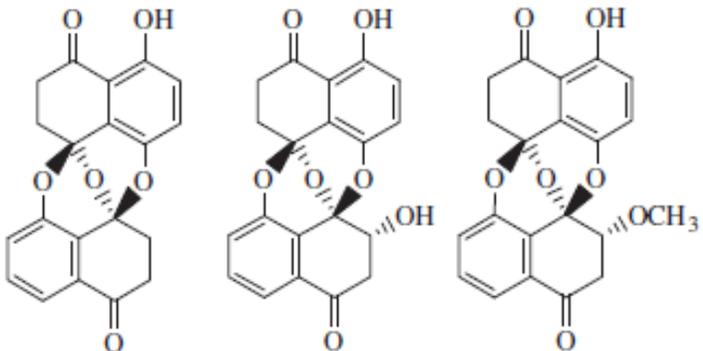
Continua

Tabela 1 - Continuação.

Micro-organismo	Planta de origem	Metabólitos secundários	Atividades biológicas	Referência
<i>Penicillium</i> spp.	<i>Cerbera manghas</i>	Fenóis: <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p data-bbox="730 778 1115 847">4-(3-hidroxybutan-2-il)-3,6-dimetilbenzo-1,2-diol</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p data-bbox="1155 778 1391 847">3,4,5-trimetil-1,2-benzenodiol</p> </div> </div>	Antibacteriana: <i>S. aureus</i>	Han et al. (2008) ¹
<i>Phoma</i> spp.	<i>Saurauia scaberrinae</i>	Fenóis: <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p data-bbox="797 1257 1032 1294">Cercosporamida</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p data-bbox="1167 1257 1339 1284">Phomodiona</p> </div> </div>	Antibacteriana: <i>S. aureus</i>	Hoffman et al. (2008) ¹

Continua

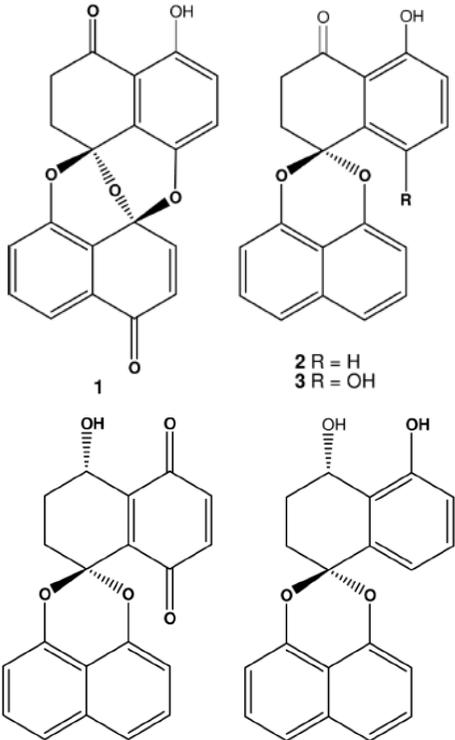
Tabela 1 - Continuação.

Micro-organismo	Planta de origem	Metabólitos secundários	Atividades biológicas	Referência
<i>Xylaria</i> spp. YX-28	<i>Ginkgo biloba</i> L.	Cumarina: Substância P3 	Antibacteriana: <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. typhi</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>Yersinia</i> sp., <i>Shigella</i> sp. e Antifúngica: <i>C. albicans</i> , <i>P. expansum</i> e <i>A. niger</i>	Liu et al. (2008) ²
<i>Edenia gomezpompae</i>	<i>Callicarpa acuminata</i>	Quinonas: três espirocetais 	Antifúngica: <i>Phytophthora capsici</i> , <i>P. parasitica</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Alternaria solani</i>	Macías- Rubalcava et al (2008) ¹

NI – Não identificado

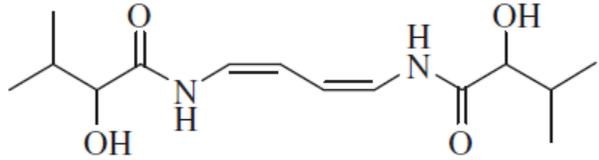
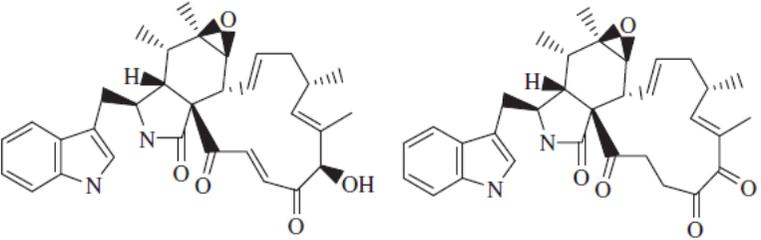
Continua

Tabela 1 - Continuação.

Micro-organismo	Planta de origem	Metabólitos secundários	Atividades biológicas	Referência
<i>Edenia</i> spp.	NI	Naftoquinonas: 	Leishmanicida	Martínez-Luis et al. (2008) ²

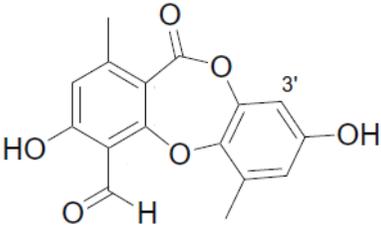
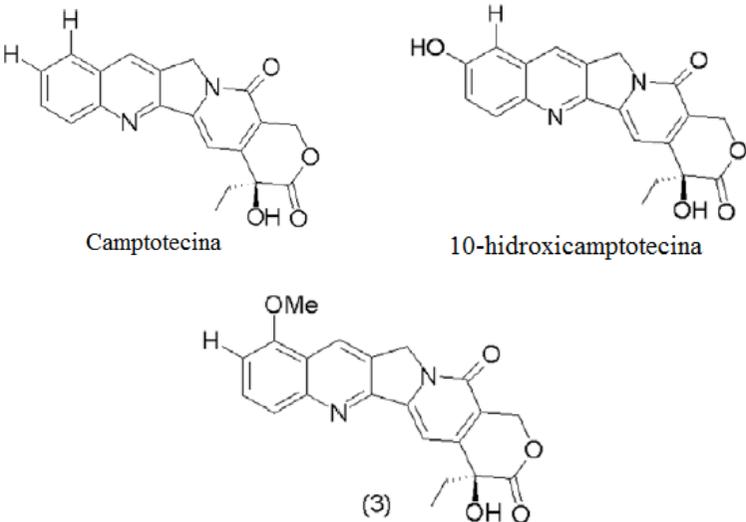
Continua

Tabela 1 - Continuação.

Micro-organismo	Planta de origem	Metabólitos secundários	Atividades biológicas	Referência
<i>Phomopsis</i> spp.	<i>Garcinia dulcis</i>	Alcalóide:  Phomoenamida	Antimicobacteriano: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Rukachaisirikul et al. (2008) ¹
<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Ginkgo biloba</i>	Alcalóides:  Chaetoglobosina A Chaetoglobosina C	Antifúngico contra <i>Mucor miehei</i>	Qin et al. (2009) ¹

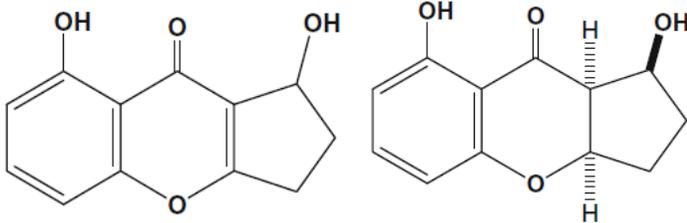
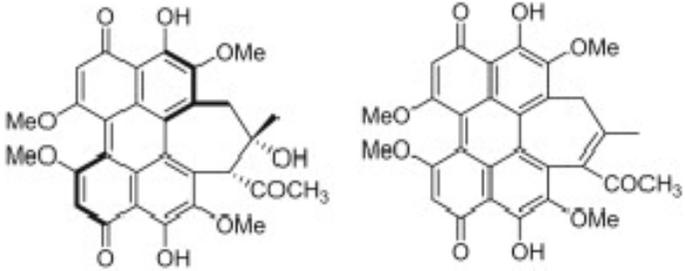
Continua

Tabela 1 - Continuação.

Micro-organismo	Planta de origem	Metabólitos secundários	Atividades biológicas	Referência
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	<i>Bidens pilosa</i>	 <p>Depsidona A</p> <p>Depsidona B – 3': CH₃</p>	Antifúngica: <i>Aspergillus terreus</i> e <i>Fusarium oxysporum</i>	Abdou et al. (2010) ²
<i>Fusarium solani</i>	<i>Apodytes dimidiata</i>	 <p>Camptotecina</p> <p>10-hidroxicamptotecina</p> <p>(3) 9-metoxi-camptotecina</p>	Citotóxica para diversos cânceres	Shweta et al. (2010) ²

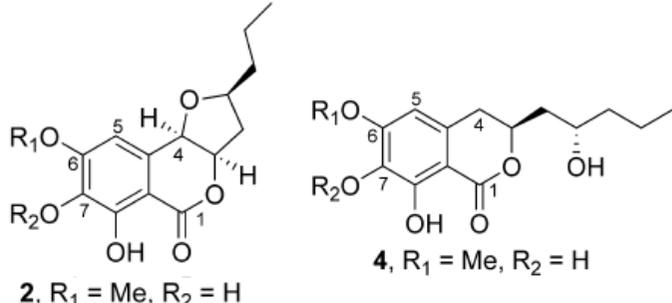
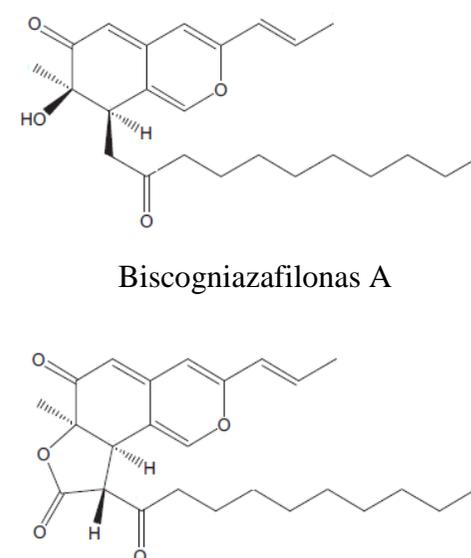
Continua

Tabela 1 - Continuação.

Micro-organismo	Planta de origem	Metabólitos secundários	Atividades biológicas	Referência
<i>Diaporthe</i> spp. P133	<i>Pandanus amaryllifolius</i>	 <p>Diaportheona A Diaportheona B</p>	Antibacteriana: <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>M. tuberculosis</i>	Bungihan et al. (2011) ²
<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Fagonia cretica</i>	 <p>Hipocrelina B Hipocrelina C</p>	Antifúngica: <i>M. violaceum</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>C. albicans</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i> .	Menga et al. (2011) ²

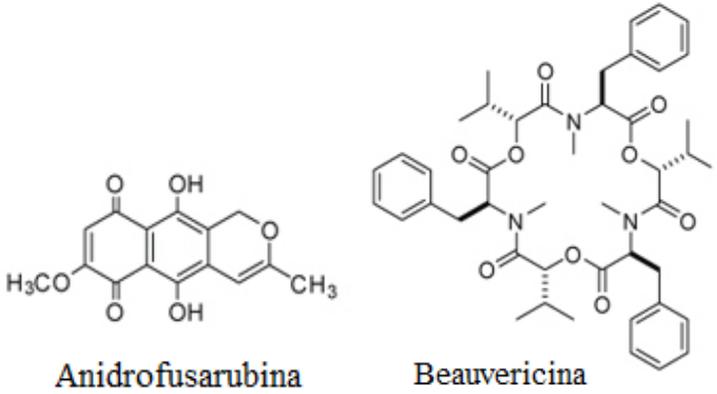
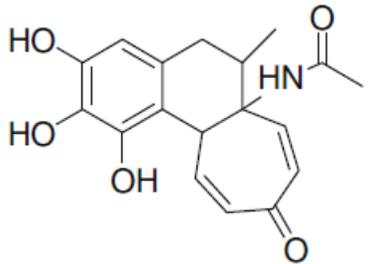
Continua

Tabela 1 - Continuação.

Micro-organismo	Planta de origem	Metabólitos secundários	Atividades biológicas	Referência
<i>Colletotrichum</i> spp. CRI535-02	<i>Piper ornatum</i>	 <p>2, R₁ = Me, R₂ = H</p> <p>4, R₁ = Me, R₂ = H</p>	Citotóxica contra HepG2 e anti radicais livres	Tianpanich et al. (2011) ²
<i>Biscogniauxia</i> <i>formosana</i> BCRC 33718	<i>Cinnamomum</i> sp.	 <p>Biscogniazafilonas A</p> <p>Biscogniazafilonas B</p>	Antimicrobacteriano contra <i>Mycobacterium</i> <i>tuberculosis</i>	Cheng et al. (2012) ²

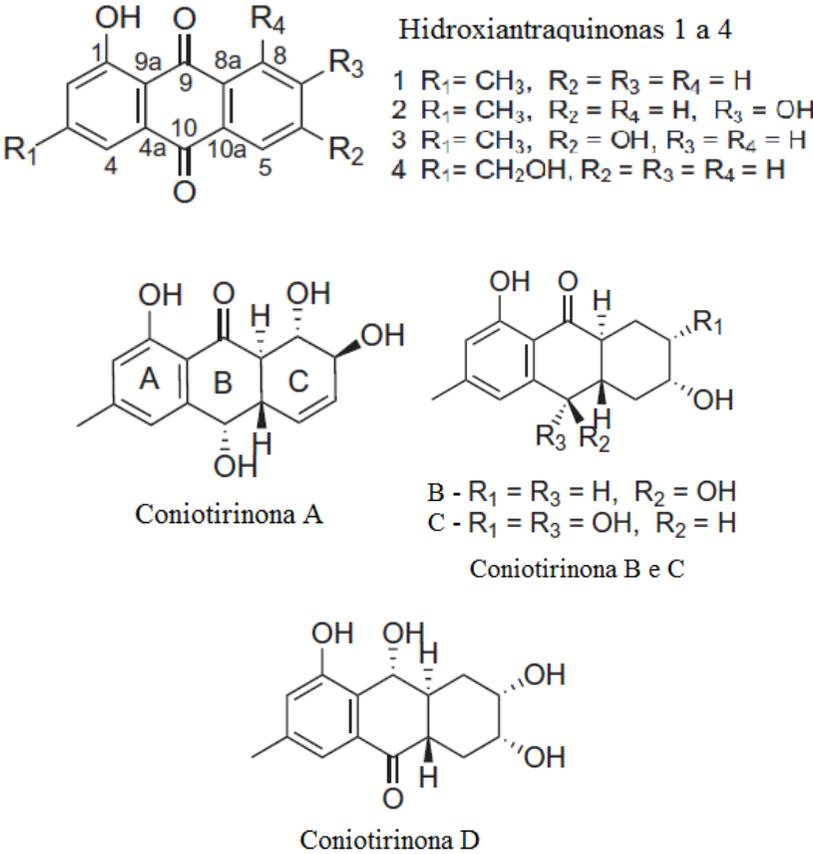
Continua

Tabela 1 - Continuação.

Micro-organismo	Planta de origem	Metabólitos secundários	Atividades biológicas	Referência
<i>Fusarium oxysporum</i> SS46	<i>Smallanthus sonchifolius</i>	 <p>Anidrofusarubina</p> <p>Beauvericina</p>	<p><i>Leishmania braziliensis</i> e citotóxica contra células tumorais</p>	Nascimento et al. (2012) ²
<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Gloriosa superba</i>	 <p>6-metil-1,2,3-triidroxi-7,8-ciclohepta-9,12-diene-11-ona-5,6,7,8-tetraleno-7-acetamida</p>	<p>Antibacteriana: <i>S. aureus</i>, <i>B. subtilis</i>, <i>E. coli</i>, <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. typhimurium</i>.</p> <p>Antifúngica: <i>S. cerevisiae</i>, <i>C. albicans</i> e <i>Cryptococcus gastricus</i>.</p>	Budhiraja et al. (2013) ²

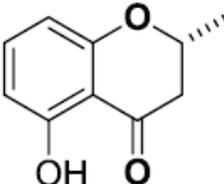
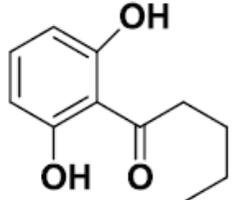
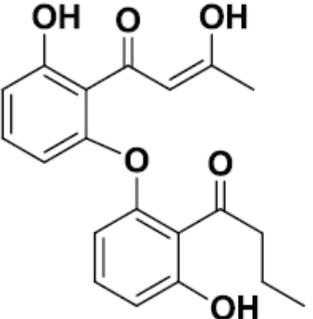
Continua

Tabela 1 - Continuação.

Micro-organismo	Planta de origem	Metabólitos secundários	Atividades biológicas	Referência
<i>Coniothyrium</i> spp.	<i>Salsola oppositifolia</i>	 <p>Hidroxi-antraquinonas 1 a 4</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 R₁ = CH₃, R₂ = R₃ = R₄ = H 2 R₁ = CH₃, R₂ = R₄ = H, R₃ = OH 3 R₁ = CH₃, R₂ = OH, R₃ = R₄ = H 4 R₁ = CH₂OH, R₂ = R₃ = R₄ = H <p>Coniotirinsona A</p> <p>Coniotirinsona B e C</p> <p>Coniotirinsona D</p>	<p>Antibacteriana: <i>E.coli</i> e <i>Bacillus megaterium</i>.</p> <p>Antifúngica: <i>Microbotryum violaceum</i> e algicida: <i>Chlorella fusca</i></p>	Sun et al. (2013) ²

Continua

Tabela 1 - Continuação.

Micro-organismo	Planta de origem	Metabólitos secundários	Atividades biológicas	Referência
<i>Cryptosporiopsis</i> spp. H2-1	<i>Clidemia hirta</i>	  2,3-diidro-5-hidroxi- 2-metilcromen-4-ona 1-(2,6-diidroxi)fenil pentan-1-ona	Antibacteriana: <i>S. aureus</i> , <i>B.cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. fluorescens</i> .	Zilla et al. (2013) ²
		 (Z)-1-(2-(2-butiril-3-hidroxifenoxi)-6-hidroxifenil)-3-hidroxibut-2-en-1-ona		

Conclusão

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Isolar substâncias dos extratos de fungos endofíticos associados a plantas medicinais com atividade antifúngica contra espécies de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*.

4.2 Objetivos Específicos

- Testar, por ensaio de microdiluição, a atividade antifúngica de diversos extratos de fungos endofíticos da Coleção de Micro-organismos e Células do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG contra *C. neoformans* e *C. gattii*;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos ativos contra *C. neoformans* e *C. gattii*;
- Cultivar em larga escala os fungos endofíticos que apresentarem atividade antifúngica;
- Realizar o fracionamento cromatográfico biomonitorado do extrato que apresentar melhor atividade antifúngica contra *C. neoformans* e *C. gattii* utilizando o ensaio de microdiluição;
- Isolar a (s) substância (s) com atividade antifúngica;
- Determinar a CIM das substâncias isoladas frente à maior número de isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*;

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Origem e manutenção dos fungos endofíticos

Neste trabalho foram utilizados 401 extratos brutos etanólicos de FE oriundos de seis plantas endêmicas de diferentes ecossistemas brasileiros (Cerrado, Mata Atlântica e Floresta Amazônica). O material vegetal utilizado foi proveniente de trinta espécimes adultos de cada planta. As espécies de plantas, parte coletada, habitat, localização por GPS e o total de extrato de fungos endofíticos (EFE) estudados estão na Tabela 2. As exsiccatas dos espécimes vegetais coletados no Cerrado e na Mata Atlântica encontram-se depositados no herbário do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, e a exsicata do material vegetal coletado na Floresta Amazônica foi depositada no herbário da Universidade Federal de Roraima. Os isolados de FE estão identificados e encontram-se depositados na Coleção de Micro-organismos e Células do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. O material vegetal foi coletado e os FE isolados conforme trabalho de Rosa et al. (2010) e Vaz et al. (2012).

Tabela 2. Espécies de plantas, parte coletada, habitat, localização por GPS e total de extratos de fungos endofíticos (EFE) avaliados contra as duas espécies de *Cryptococcus*.

Espécies de plantas	Parte coletada	Habitat e localização por GPS	Total de EFE
<i>Solanum cernuum</i>	Folhas e caule	Mata Atlântica (19°52'S, 43°58'W)	23
<i>Eugenia aff. Bimarginata</i>	Folhas	Cerrado, Parque Estadual do Jalapão (19°52'S, 43°58'W)	7
<i>Myrciaria floribunda</i>	Folhas	Cerrado, Parque Estadual do Cantão (09°20'S, 49°58'W)	7
<i>Alchornea castaneifolia</i>	Folhas	Cerrado, Parque Estadual do Cantão (09°20'S, 49°58'W)	20
<i>Stryphnodendron adstrigens</i>	Folhas e caule	Cerrado, Serra de São José (21°05'S, 44°12'W) e Parque Nacional da Serra do Cipó (19°30'S, 43°54'W)	150
<i>Carapa guianensis</i>	Folhas	Floresta Amazônica, Área da EMBRAPA em São João da Baliza, Roraima (0°57'02"N, 59°54'41"W)	194

Os fungos filamentosos estão mantidos em água destilada estéril na temperatura ambiente (CASTELANI, 1967). As leveduras em caldo GYMP a - 80 °C (GYMP: glicose

2 %, extrato de levedura 0,5 %, extrato de malte 1 % e fosfato de sódio monobásico 0,2 %). As plantas de origem e os códigos dos fungos endofíticos avaliados por ensaio de microdiluição quanto à atividade antifúngica frente às duas espécies de *Cryptococcus* estão na Tabela 3.

Tabela 3. Espécies de plantas e código dos fungos endofíticos avaliados contra as duas espécies de *Cryptococcus*.

Espécies de plantas	Código dos fungos endofíticos UFMGCB
<i>Solanum cernuum</i>	1823, 1825, 1831, 1834, 1860, 1884, 1886, 06C1C*, 2147, 2163, 2187, 2188, 2190, 2191, 2201, 2206, 2222, 2223, 2228, 2237, 2239, 2242 e 2246
<i>Eugenia</i> aff. <i>Bimarginata</i>	2012, 2025, 2032, 2033, 2038, 2040 e 2060
<i>Myrciaria floribunda</i>	1974, 1978, 1985, 1986, 1987, 1988 e 1991
<i>Alchornea castaneifolia</i>	1935, 1936, 1938, 1939, 1941, 1942, 1945, 1947, 1957, 1959, 1961, 1963, 1967, 1969, 1996, 2000, 2001, 2002, 2006, 2007
<i>Stryphnodendron adstrigens</i>	4611, 4714, 4793, 5018-5034, 5036-5120, 5123-5156, 5158-5167 e levedura A*
<i>Carapa guianensis</i>	4806-4820, 4822-4834, 4836-4837, 4839-4933, 4936-4948, 4950-5006

* levedura endofítica

5.2 Identificação dos fungos endofíticos

A identificação dos FE foi realizada por colaboradores do trabalho através da análise comparativa da sequência gênica da região ITS do gene rRNA com as sequências depositadas no GeneBank. Os procedimentos para identificação dos FE encontram-se descritos nos trabalhos de Carvalho et al. (2012), Vieira et al. (2012), Vaz et al. (2012) e Ferreira (2013).

O fungo endofítico ativo também foi submetido ao microcultivo para estimular a esporulação em ágar batata dextrose (BDA), BDA diluído a 10 %, ágar água, fubá e Czapek nas temperaturas de 25° e 30 °C por 7, 14, 21 e 30 dias para avaliação da micromorfologia.

5.3 Cultivo e obtenção dos extratos brutos dos fungos endofíticos para a triagem da atividade antifúngica

Os fragmentos de 2,0 mm diâmetro dos 401 FE foram cultivados em placas de Petri (90,0 mm diâmetro) contendo ágar batata dextrose (BDA, Himedia, Índia) por 15 dias a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. A massa fúngica foi transferida para tubos Falcon de 50 mL, macerada em 40 mL de etanol (PA, $\geq 99.8\%$, Vetec, Brasil), e mantida em contato com o solvente por 48h a temperatura ambiente (CAMPOS et al., 2008; COTA et al., 2008). A solução de cada extrato bruto foi filtrada em papel de filtro e mantida em câmara fria entre $4-8^\circ\text{C}$. Para os testes, alíquotas dos extratos dos FEs foram secos em centrífuga à vácuo a 35°C (CARVALHO et al., 2012; VIEIRA et al., 2012). Como controle de esterilidade do meio de cultura, três placas de Petri com BDA foram incubadas sob as mesmas condições e submetidas igualmente ao procedimento de extração para originar o controle do extrato do meio.

5.4 Preparo das soluções estoques dos extratos de fungos endofíticos

Os extratos de FE foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO, $\geq 99.9\%$, Sigma[®], França) de forma a originar soluções estoques na concentração inicial de 100,0 mg/mL. As soluções foram preparadas no momento do uso e mantidas posteriormente em câmara fria entre $4-8^\circ\text{C}$.

5.5 Ensaios biológicos

5.5.1 Leveduras utilizadas nos ensaios biológicos

Todas as amostras de leveduras utilizadas encontram-se depositadas na Coleção de Micro-organismos e Células do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG.

Na triagem dos extratos de FE, durante o fracionamento biomonitorado e nos ensaios de microscopia eletrônica de varredura, foram utilizados os isolados de *C. neoformans* ATCC 24067 e *C. gattii* ATCC 24065.

Após isolamento das substâncias ensaios de sensibilidade foram realizados com *Candida albicans* ATCC 18804 e *C. krusei* ATCC 6258. Estes ensaios foram realizados conforme M27-A3 (CLSI, 2008).

Os ensaios de combinação de substâncias foram realizados para avaliação do comportamento das substâncias isoladas junto aos antifúngicos AMB e FC frente aos isolados de *C. neoformans* ATCC 24067 e ATCC 28957, e de *C. gattii* ATCC 24065 e ATCC 32608 conforme (PILLAI, MOELLERING Jr., ELIOPOULOS, 2005).

5.5.2 Preparo do inóculo de *Cryptococcus* spp.

As amostras de *Cryptococcus* spp. foram preparadas conforme o documento 7.1 (EUCAST, 2002), com modificações na temperatura de incubação ($30 \pm 2^\circ\text{C}$), e no preparo da suspensão do inóculo. O inóculo foi calibrado para valor de absorbância correspondente à da escala 1,0 de McFarland no espectrofotômetro a 530 nm que corresponde a 10^5 UFC/mL (ABDEL-SALAM, 2005; DIAS, 2006; OUATTARA et al., 2008; PEREIRA, 2008; ZARAGOZA et al., 2011).

Cada poço da microplaca foi inoculado com 50 μL da suspensão das leveduras (exceto os poços A a D da coluna 1 – controle de esterilidade do meio RPMI supl.). O volume final de cada poço da microplaca foi de 100 μL e a concentração final do inóculo nos poços foi de aproximadamente $1-5 \times 10^5$ UFC/mL.

5.5.3 Ensaios de triagem dos fungos endofíticos por microdiluição

Neste ensaio foi utilizado o meio RPMI 1640 suplementado com 2 % de glicose e ácido 3-N-morfolino propanosulfônico 0,165 mol/L (RPMI supl.). Este meio foi preparado conforme descrito no documento 7.1 (EUCAST, 2002) (ANEXO A).

Na triagem por microdiluição foram preparadas 4 microplacas (duas para cada espécie de *Cryptococcus*). Cada poço da placa entre as colunas 2 a 11 correspondeu a um extrato de FE a 500 $\mu\text{g/mL}$ (concentração adotada para aumentar a probabilidade de se encontrar maior número de extratos de FE com atividade antifúngica). Cada placa permitiu a avaliação de 80 extratos de FE por vez.

Os controles foram realizados nas colunas 1 e 12:

- a) Controle de esterilidade do meio – CEM: 100 μL do meio RPMI supl. (coluna 1, poços A a D).
- b) Controle negativo – CN: 50 μL de meio RPMI supl. e 50 μL de inóculo (coluna 1, poços E a H).

c) Controle do diluente dos extratos – DMSO: 50 μ L de meio RPMI supl. com DMSO a 0,5 % e 50 μ L de inóculo (coluna 12, poços A a D).

d) Controle de antifúngico – AMB: 50 μ L de meio RPMI supl. com AMB a 4,0 μ g/mL e 50 μ L de inóculo (coluna 12, poços E a H).

A figura a seguir apresenta a disposição dos extratos de FE e dos controles nas microplacas empregadas nos testes de microdiluição.

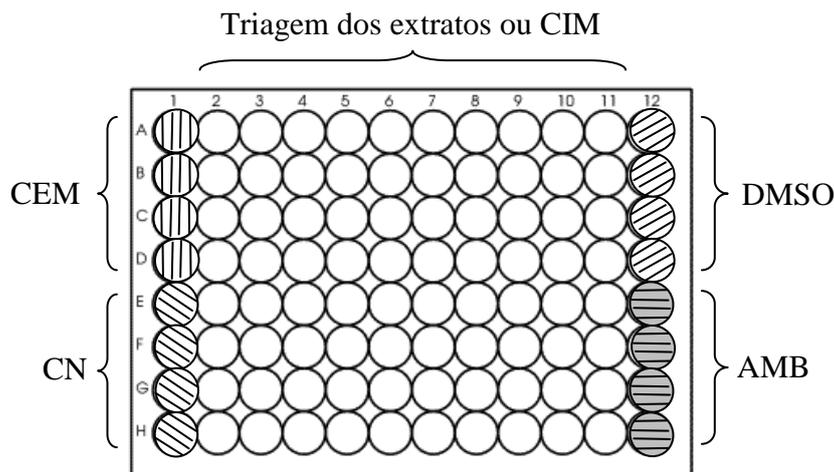


Figura 7 – Esquema da placa de microdiluição. Os ensaios de triagem e CIM foram realizados nas colunas 2 a 11. Como controles na coluna 1: CEM - esterilidade do meio RPMI supl. (poços A-D), CN - controle negativo contendo inóculo e meio de cultura (poços E-H) e na coluna 12: Controle do DMSO – diluente dos extratos (poços A-D) e Controle com antifúngico - AMB (poços E-H).

Procedimentos da triagem:

As soluções estoque dos extratos de FE foram diluídas para preparo da solução de trabalho a 1.000 μ g/mL em RPMI supl., em seguida, transferiu-se 50 μ L da solução de trabalho para os poços das placas de microdiluição. O inóculo da levedura foi preparado e dispensado nas microplacas contendo o extrato de FE conforme descrito no item 5.5.2.

As leveduras foram incubadas a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 h. Após incubação, adicionou-se nos poços 10,0 μ L de solução do corante ‘methyl thiazolyl tetrazolium’ - MTT (Amresco[®]) a 5,0 mg/mL (ANEXO B). As microplacas com os testes foram novamente incubadas a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ por mais 4 h. Em seguida adicionou-se aos poços 100,0 μ L de solução de dodecilsulfato de sódio (ANEXO C) e misturou-se até obter-se coloração homogênea.

As absorbâncias foram medidas no equipamento leitor de placas de microdiluição VERSAmax (Molecular Devices), programa Softmax[®], no comprimento de onda de 570 nm e as porcentagens de inibição (% Inib.) foram calculadas conforme a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Inib.} = \frac{\text{DOCN} - \text{DOEFE}}{\text{DOCN}} \times 100$$

DOCN – Densidade óptica do poço controle negativo, onde a levedura cresce sem interferência de extrato ou do DMSO.

DOEFE – Densidade óptica do poço com extrato do fungo endofítico

O ensaio foi considerado válido quando nos poços dos controles houve inibição acima de 90% para AMB conforme documento 7.1 (EUCAST, 2002), ausência de crescimento de contaminantes no controle de esterilidade do meio e crescimento das leveduras no controle do DMSO. Após detecção da atividade antifúngica do extrato de FE foi determinada a CIM.

5.5.4 Ensaio para determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

As CIMs dos extratos de FE foram determinadas em ensaios de microdiluição, onde as leveduras de *Cryptococcus* foram cultivadas em meio RPMI supl. contendo diferentes concentrações dos extratos. A solução de maior concentração foi obtida pela diluição de 5 µL da solução estoque em 495 µL de meio RPMI supl. (concentração inicial = 1.000 µg/mL). Em seguida, as demais soluções foram preparadas pela transferência sucessiva de 250 µL entre os microtubos que continham 250 µL de RPMI suplementado. Foram preparadas dez concentrações dos extratos de FE que variaram entre 1.000 – 1,94 µg/mL. Posteriormente, transferiu-se 50 µL de cada diluição, em ordem decrescente de concentração, para os poços das colunas de 2 a 11, onde cada linha correspondeu a um extrato de FE. O inóculo da levedura foi preparado e dispensado nas microplacas conforme descrito no item 5.5.2. As microplacas foram incubadas e as absorbâncias dos poços medidas conforme item 5.5.3.

As concentrações finais dos extratos dos FE nos ensaios de CIM após adição do inóculo variaram entre 500–0,97 µg/mL com volume final no poço de 100 µL. Concentrações inferiores a estas foram utilizadas em testes adicionais para a obtenção dos valores de CIMs quando necessário.

Cada amostra de extrato de FE foi testada em duplicata para cada espécie de *Cryptococcus* e cada microplaca avaliou uma amostra de *Cryptococcus* spp. por vez frente a 8 extratos de FE ativos. A CIM foi determinada nos poços com menor concentração do extrato do FE e que cumpriram o critério do item 5.5.3, correspondeu à média dos poços ativos das duas placas.

5.6 Estudo químico biomonitorado do fungo endofítico UFMGCB 2032 para atividade antifúngica

5.6.1 Cultivo e extração em larga escala do fungo endofítico UFMGCB 2032 e avaliação da atividade antifúngica

Inicialmente o FE UFMGCB 2032 foi cultivado em 25 placas com BDA (Himedia, Índia) nas condições descritas no item 5.3. O segundo cultivo do FE UFMGCB 2032 em larga escala foi realizado transferindo-se cinco fragmentos de 2,0 mm de diâmetro para 600 placas de Petri (90 mm de diâmetro) contendo o meio BDA. As placas foram cultivadas nas mesmas condições do primeiro cultivo.

Alíquota do micélio foi separado para determinação da massa seca após cultivo em BDA a 25 °C por 15 dias. O micélio de 10 placas do FE UFMGCB 2032 foi separado do meio e teve massa úmida de 25,37 g, em seguida o material foi seco em estufa a 37 °C até peso seco constante de 3,95 g. O peso seco do micélio por placa foi de 0,395 g.

5.6.2 Partição líquido-líquido com solventes de polaridades crescentes do extrato bruto do fungo endofítico UFMGCB 2032

O material fúngico, micélio e meio BDA, foram macerados e extraídos separadamente com acetato de etila (AcOEt, PA, $\geq 99.5\%$, Vetec, Brasil) por quatro vezes com intervalo de 48 h entre as filtrações. A extração iniciou diretamente com AcOEt porque na primeira estratégia de fracionamento do primeiro cultivo em larga escala encontrou-se os menores valores de CIM na fração solúvel em acetato. O extrato foi concentrado em rotavapor a vácuo a 45°C e o solvente residual evaporado em centrífuga à vácuo a 35°C. Em seguida os extratos foram dissolvidos em 500 mL da mistura metanol (MeOH, Tedia[®], Brasil) e água Milli-Q (1:3) e submetido à partição, sucessivas, em funil de separação utilizando solventes de

polaridades crescentes: hexano (HEX, PA, $\geq 99.0\%$, Dinâmica, Brasil), diclorometano (DCM, PA, $\geq 99.9\%$, Proquímios, Brasil), acetato de etila (EtOAc PA, $\geq 99.5\%$, Vetec, Brasil). No processo de partição do extrato bruto foram utilizados 12 L de cada solvente.

Como controle, o meio BDA sem inóculo foi extraído e processado da mesma forma.

5.6.3 Métodos cromatográficos

5.6.3.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e soluções reveladoras

Para CCD foram utilizadas placas de sílica gel 60 F₂₅₄ sobre folha de alumínio (Merck®). As CCD das frações obtidas após o fracionamento 1 foram eluídas com a mistura CHCl₃:MeOH:NH₄OH (10:3:0,5) e, após o fracionamento 2 com a mistura CHCl₃:MeOH:NH₄OH nas proporções: 10:2,25:0,5; 10:3,25:0,5 e 10:4,5:0,5. As revelações cromatográficas foram realizadas por irradiação com luz ultravioleta (254 e 366 nm) em cabine de UV, lâmpada Camag e/ou com as soluções de vanilina e H₂SO₄ (ANEXO D). As placas depois de borrifadas com as soluções reveladoras foram aquecidas a 100°C por 5-10 min. e avaliadas no visível.

5.6.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os perfis cromatográficos em escala analítica foram realizados em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Shimadzu®, constituído de injetor manual, detector com arranjo de diodos modelo SPD-M10A e bomba modelo LC-10A. Todos os perfis cromatográficos foram obtidos com fluxo de 1,0 mL/min., em coluna de octadecilsilano (Shimpack – C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm, d.i.) e com misturas de metanol (MeOH grau CLAE, Tedia®, Brasil) ou acetonitrila (ACN grau CLAE, Tedia®, Brasil) em água Milli-Q (Millipore®).

As separações em escala semi-preparativa foram realizados em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Shimadzu®, constituído de injetor manual, detector no UV com modo de detecção dual, modelo SPD-10A, bomba modelo LC-8A e fluxo de 8,0 mL/min. As purificações em fase reversa foram realizadas em coluna de octadecilsilano (Shimpack C₁₈, 5 µm, 20 x 250 mm, d.i.) e com misturas de metanol (MeOH) ou acetonitrila (ACN) em água Milli-Q.

As frações obtidas nas separações realizadas em escala semi-preparativa foram coletadas conforme os picos originados (coleta por pico) nos cromatogramas. As frações foram secas a 40°C em centrífuga a vácuo (SpeedVac[®]) e após o cálculo da massa de cada uma, soluções foram preparadas e armazenadas em geladeira (8-10°C) até os ensaios para avaliação da atividade antifúngica.

5.6.3.3 Fracionamento 1 por CLAE em escala semi-preparativa e avaliação da atividade antifúngica

A fração solúvel em AcOEt foi dissolvida na mistura MeOH:água Mili-Q (1:1) com auxílio do ultrassom, em seguida a solução foi centrifugada e o sobrenadante injetado no CLAE em escala semi-preparativa equipado com coluna C₁₈ e utilizando gradiente de MeOH em água: 10-50 % de MeOH em 30 min., de 50-95 % em 50 min., 95-100 % em 51 min. e 100 % até 68 minutos e fluxo de 8 mL/minuto.

A atividade antifúngica das frações foi realizada conforme o ensaio de triagem do item 5.5.3, sendo a concentração final do poço de 250 µg/mL. Houve redução na concentração (de 500 para 250 µg/mL) para diminuir a quantidade de massa utilizada nos ensaios biológicos e pelo fato do valor de CIM da fração solúvel em acetato de etila ter ficado abaixo de 100 µg/mL.

5.6.3.4 Fracionamento 2 por CLAE em escala semi-preparativa e avaliação da atividade antifúngica

As frações ativas provenientes do fracionamento 1 (da fração AcOEt) e de massa superior a 35,0 mg (frações A.001.9 a A.001.14), foram submetidas a testes em CLAE com coluna C₁₈ em escala analítica para escolha das melhores condições para o fracionamento 2. Cada fração foi re-fracionada separadamente por CLAE em escala semi-preparativa equipado com coluna C₁₈ e utilizando gradiente de ACN (ACN grau CLAE, Tedia[®], Brasil) em água: 30 % ACN por 10 min., 30-50 % de ACN em 24 min., de 50-75 % ACN em 50 min., de 75-100% ACN em 60 min. e 100 % ACN até 90 minutos e fluxo de 8,0 mL/minuto.

A atividade antifúngica das sub-frações foi realizada para as frações com massa acima de 4,0 mg conforme o ensaio para determinação de CIM do item 5.5.4.

5.6.3.5 Avaliação da pureza das substâncias isoladas

As sub-frações com massa superior a 4,0 mg foram dissolvidas em ACN:água Milli-Q na concentração de 1,0 mg/mL e 20 µL foram injetados no CLAE em escala analítica com coluna C₁₈ e detector com arranjo de fotodiodos, utilizando gradiente de ACN em água: 30 % ACN por 5 min., 30-50 % de ACN em 12 min., de 50-75 % ACN em 25 min., de 75-100% ACN em 30 min. e 100 % de ACN até 45 minutos e fluxo de 1,0 mL/ minuto.

Alíquotas das substâncias isoladas também foram aplicadas em placas de CCDs que foram eluídas com a mistura de clorofórmio, metanol e hidróxido de amônio (com variações nas proporções de metanol e hidróxido de amônio) e reveladas conforme item 5.6.3.1.

5.6.4 Métodos Físicos

5.6.4.1 Espectros de massas (EM)

Os espectros de massas das substâncias foram obtidos por CLAE (Thermo Finnigan Surveyor, PDA Plus detector, Autosampler Plus, LC Pump Plus, software Xcalibur 2.0) acoplado ao espectrômetro de massas (ESI-QTOF, maXis ETD, Bruker, software Compass 1.4). As substâncias foram dissolvidas em MeOH na concentração de 150 µg/mL, e alíquotas de 10 µL de foram injetadas no cromatógrafo. A corrida foi realizada com gradiente linear de ACN em água com 0,1% de ácido fórmico (1,0-100 % em 12,5 min. E 100 % até 29 min.) e fluxo de 0,2 mL/min. em coluna Waters Atlantis (C18, 3µm, 2,1x150mm).

5.6.4.2 Espectros de ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN foram registrados em aparelho Bruker 400 UltraShield®, da Plataforma de Métodos Analíticos de Farmanguinhos (FIOCRUZ, RJ). Como referência interna utilizou-se o tetrametilsilano (TMS) e as substâncias isoladas foram dissolvidas em DMSO deuterado contendo 0,1 % de TMS.

Após cumprimento dos objetivos iniciais do trabalho foram realizados os seguintes ensaios biológicos: combinação das substâncias isoladas com os antifúngicos AMB e FC, atividade citotóxica, atividade leishmanicida, ensaio contra espécies de *Candida* e a

microscopia eletrônica de varredura das duas espécies de *Cryptococcus* após tratamento com as substâncias isoladas. Os ensaios adicionais foram realizados conforme descrito a seguir.

5.6.5 Ensaios com as substâncias isoladas

5.6.5.1 Ensaios de combinação de substâncias

As substâncias isoladas foram avaliadas em ensaio de microdiluição bidimensional, denominado de método do tabuleiro de xadrez ('checkerboard') frente aos antifúngicos AMB e FC (MOODY, 1991; PILLAI, MOELLERING Jr., ELIOPOULOS, 2005).

Procedimentos:

As CIMs das substâncias isoladas e dos antifúngicos AMB e FC foram determinadas frente às leveduras de *Cryptococcus* conforme descrito no item 5.5.4 e, conforme os valores das CIMs foram estabelecidas as faixas de concentrações para cada substância e fármaco (o valor da CIM está incluído na faixa de concentrações). As faixas de concentrações utilizadas nos ensaios foram: 0,031-4,0 µg/mL para AMB, 0,12-16,0 µg/mL para o FC, 0,11-15,0 µg/mL para a substância **1** e 0,23-30 µg/mL para a substância **2**.

As soluções de maior concentração das substâncias e dos antifúngicos foram preparadas em meio RPMI supl. com concentração quatro vezes superior à concentração final na placa e, em seguida, estas foram diluídas em série a fim de se obter oito soluções de concentrações decrescentes. A concentração inicial foi 4 vezes maior por que ocorrem posteriormente duas diluições: uma após adição da solução com a substância ou fármaco a ser combinado, e outra após adição do inóculo da levedura aos poços da microplaca (LEWIS et al. 2002). Após preparo das soluções, foram dispensados 25 µL de cada diluição das substâncias, em ordem decrescente de concentração, nos poços das colunas 2 a 9; e em seguida, foram adicionados 25 µL de cada diluição dos antifúngicos, em ordem decrescente de concentração, nos poços das linhas A a H das colunas 2 a 9. Os poços das colunas 1 e 12 foram utilizados como controles conforme esquema da Figura 5.

O inóculo da levedura foi preparado e dispensado nas microplacas conforme descrito no item 5.5.2. As microplacas foram incubadas e as absorbâncias dos poços medidas conforme item 5.5.3.

As CIMs das substâncias e dos antifúngicos quando combinados foi determinada no poço onde a menor concentração da substância junto com o antifúngico foi capaz de inibir o crescimento da levedura (poço de coloração amarela após revelação com MTT). As CIMs dos antifúngicos não combinados foram determinadas nos poços onde houve inibição de crescimento de 90 % para AMB e de 80% para o FC frente aos poços do CN (controle negativo - com levedura e sem antifúngico).

As possíveis interações ocorridas pela combinação das substâncias com os antifúngicos são classificadas como: sinergismo, indiferente ou antagonismo após cálculo do Índice da Concentração Inibitória Fracional (ICIF) através da seguinte fórmula:

$$\text{ICIF} = \text{CIF substância} + \text{CIF antifúngico}$$

onde, $\text{CIF substância} = \text{CIM da substância combinada} / \text{CIM da substância}$

$\text{CIF antifúngico} = \text{CIM do antifúngico combinado} / \text{CIM antifúngico}$

Após cálculo do ICIF, a interação da substância com o antifúngico foi considerado como sinergismo quando ICIF foi $\leq 0,5$; indiferente quando $0,5 < \text{ICIF} \leq 4,0$; e antagonismo para $\text{ICIF} > 4,0$ (LEWIS et al., 2002; CUENCA-ESTRELLA, 2004; JOHNSON et al., 2004; MUKHERJEE et al., 2005; LEITE, 2010).

5.6.5.2 *Ensaio com linhagens de células tumorais humanas ou de atividade citotóxica*

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Química de Produtos Naturais do Centro de Pesquisas René Rachou sob coordenação da Dr.a Tânia M. A. Alves. Os procedimentos foram realizados conforme protocolo do Instituto Nacional do Câncer dos EUA descrito por Monks et al. (1991) e Shoemaker (2006). Nos ensaios foram utilizadas as linhagens tumorais humanas MCF-7 (mama) e TK-10 (renal). As suspensões celulares foram diluídas conforme a linhagem, e os poços das placas de microdiluição receberam 100 μL que continham 5.000 células MCF-7 e 15.000 células TK-10. As células foram incubadas por 24 h a 37°C em estufa de CO_2 e 100 % de umidade para estabilização da cultura e então, foram preparadas soluções das substâncias isoladas em água para injeção a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e alíquotas de 10 μL foram transferidas para os poços (triplicata) que tiveram concentração final de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As culturas com as substâncias foram incubadas por 72 h nas condições anteriores,

em seguida foram fixadas pela adição de 50 µL de ácido tricloroacético a 50% v/v (concentração final de 10 %) e incubação das placas por 1 h a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados, as placas foram lavadas 5 vezes com água e secas à temperatura ambiente. As células foram coradas com sulforodamina B. Foram adicionados 50 µL de sulforodamina a 0,4 % v/v nos poços durante 10 minutos. A sulforodamina não-ligada foi removida pela lavagem com água por 5 vezes e com ácido acético a 1 % v/v. As placas foram secas à temperatura ambiente, o corante dos poços foi solubilizado em tampão Tris a 10 mM. As densidades ópticas de cada poço foram medidas em espectrofotômetro a 515 nm com o programa SoftMax versão 4.0 (VERSAmax, Molecular Devices).

As porcentagens de inibição do crescimento (% IC) foram calculadas a partir das absorbâncias medidas nos poços contendo as células após incubação com as substâncias isoladas (As) frente aos poços controles contendo o inóculo celular inicial (Ai) e a cultura celular crescida por 48 h sem antifúngico (Af), através da fórmula: % IC = [(As-Ai)/(Af-Ai)] x 100. A fórmula permite quantificar a inibição do crescimento (porcentagens entre 1-100 %) e a morte celular (porcentagens < 0 %).

As substâncias foram consideradas citostáticas quando inibiram a multiplicação celular em pelo menos 80 % e citocidas quando inibiram em pelo menos 100%. Como controle positivo foi empregado o etoposídeo a 16 µg/mL.

5.6.5.3 Ensaios com formas amastigotas-like de *Leishmania (L.) amazonensis* ou de atividade leishmanicida

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Química de Produtos Naturais do Centro de Pesquisas René Rachou sob coordenação da Dr.a Tânia M. A. Alves. Nos ensaios as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (isolado IFLA/BR/196/PH-8) foram incubadas em meio Schneider pH 7,2 a 26°C por 9 dias. Em seguida, estas foram diferenciadas para a forma amastigota após aumento da temperatura para 32°C e redução do pH para 6,0. Após 7 dias, a concentração dos parasitas foi ajustada para 10⁸ células per mL, e então 90 µL foram transferidos para os poços das placas. Foram preparadas soluções das substâncias isoladas em água para injeção a 200 µg/mL, e alíquotas de 10 µL foram transferidas para os poços (triplicata) que tiveram concentração final de 20 µg/mL. Como controle foi utilizada a AMB (0,2 µg/mL). As placas foram incubadas a 32 ±2°C por 72 h, e a

quantidade de parasitas foi estimada através de ensaio colorimétrico com MTT preparado a 5,0 mg/mL (CALLAHAN et al., 1997; CARVALHO, 1994; TEIXEIRA et al., 2002).

As porcentagens de inibição (% I) foram calculadas a partir das absorbâncias medidas nos poços contendo os parasitos incubados com as substâncias isoladas (A_{subst}) frente às absorbâncias dos poços controle com AMB (A_{controle}), que foram aplicadas na fórmula: % I = $[1 - (A_{\text{subst}} - A_{\text{controle}})] \times 100$, que expressa a porcentagem de parasitas mortos em relação ao antifúngico controle (AMB).

Análises estatísticas

Ensaio para determinação da CIM do extrato bruto do FE ativo, da partição e das substâncias isoladas foram realizados frente à diferentes isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*, e as CIMs foram comparadas estatisticamente pelo programa GraphPad Prism versão 5.0 - Teste de Wilcoxon com nível de significância para valor de $P < 0,05$.

5.6.5.4 Microscopia eletrônica de varredura das espécies de Cryptococcus após tratamento com as substâncias isoladas

As duas espécies de *Cryptococcus* foram cultivadas na presença das substâncias isoladas conforme descrito nos procedimentos a seguir. Estas foram preparadas em concentração subinibitória para realização dos ensaios de microscopia eletrônica de varredura - MEV (MUKHERJEE, CLEARE, CASADEVALL, 1995; WANG, AISEN, CASADEVALL, 1996). Como controle as leveduras de *C. neoformans* ATCC 24067 e *C. gattii* ATCC 24065 foram cultivadas sem interferência de antifúngicos.

Procedimentos:

As substâncias isoladas foram dissolvidas em RPMI supl. em concentração duas vezes maior que a concentração subinibitória (tubos em duplicata). Os inóculos de *C. neoformans* e *C. gattii* foram preparados conforme descrito no item 5.5.2 e estes foram adicionados a solução contendo as substâncias a serem testadas, posteriormente os preparados foram incubados a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ por 72 h e sob agitação de 150 rpm. A suspensão de leveduras foi centrifugada a 4.000 rpm por 10 min., o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado

por 3 vezes com tampão PBS pH 7,0. As leveduras foram centrifugadas nas condições descritas anteriormente e, o precipitado foi incubado por 5 h em solução de glutaraldeído (2,5 %) em tampão PBS para fixação das leveduras. As leveduras foram centrifugadas nas condições anteriores, as células foram suspensas em tampão PBS e armazenadas em geladeira até preparo das lâminas.

As lâminas com as leveduras foram preparadas pela técnica do CAPI (Centro de Aquisição e Processamento de Imagens) do ICB/UFMG, sob direção do Dr. Hélio Chiarini-Garcia. Os procedimentos realizados, resumidamente, foram: Incubou-se as leveduras por 1 h em solução de tetróxido de ósmio a 1 % em tampão PBS a 0,1 M. Transferiu-se 1 gota da suspensão das leveduras para lamínulas cobertas com L-polilisina, em seguida o material foi desidratado em gradiente crescente de etanol (30°GL, 50-70° GL, 80-95° GL e 100°GL) e no equipamento de ponto crítico de CO₂. As lamínulas foram metalizadas com ouro-paládio e armazenadas em dessecador até visualização no microscópio eletrônico de varredura (MEV) DSM 950 (Zeiss, Alemanha).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Avaliação preliminar da atividade antifúngica de fungos endofíticos

A pesquisa de FE produtores de metabólitos ativos na coleção de micro-organismos e células do ICB/UFMG foi realizada contra as duas espécies de *Cryptococcus* (*C. neoformans* e *C. gattii*). Nesta foram realizados ensaios de microdiluição com os extratos brutos etanólicos de isolados fúngicos que já haviam, previamente, apresentado atividade antifúngica descrita nos trabalhos de Vaz (2012) e Vieira (2012).

A triagem foi realizada em 401 extratos de FE (399 fungos filamentosos e 2 leveduras endofíticas) testados em concentração única de 500 µg/mL. No geral, mais de 99,7 % dos 401 extratos de FE testados apresentaram porcentagem de inibição inferior a 75 % frente às duas leveduras. Estes resultados de triagem de atividade antifúngica indicam que a maioria dos extratos de FE avaliados não apresentou atividade inibitória significativa contra as espécies de *Cryptococcus* estudadas, com exceção dos extratos dos fungos endofíticos UFMGCB 2001, UFMGCB 2032 e UFMGCB 4963. Na triagem inicial apenas o isolado UFMGCB 2032 apresentou atividade antifúngica contra as duas espécies de *Cryptococcus* (inibição acima de 99 % a 500 µg/mL frente às duas leveduras). Este provém da planta *E. aff. Bimarginata* coletada no cerrado. O isolado UFMGCB 2001 foi ativo somente contra *C. gattii* (inibição de 97 % a 500 µg/mL) e provém da planta *A. castaneifolia* que também foi coletada no cerrado. Na triagem realizada com os 344 extratos de FE oriundos das plantas *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão) e *Carapa guianensis* (Andiroba), que não haviam sido testados previamente quanto a atividade antifúngica, foram encontrados dois isolados ativos somente contra *C. gattii* que apresentaram porcentagens de inibição acima de 75,0 %. Estes extratos foram preparados a partir dos FEs UFMGCB 4963, isolado da planta *C. guianensis*, coletada na floresta amazônica e com inibição de 77 % e, o extrato do FE UFMGCB 5155, isolado da planta *S. adstringens*, coletada no cerrado com inibição de 98 % frente às leveduras de *C. gattii*, que corresponderam a 0,5 % e 0,7 % do total de FE isolados, respectivamente. Os resultados expressos em faixas de porcentagem de inibição podem ser observados nos gráficos 1 a 6 (FIGURA 8 e FIGURA 9).

No entanto, apesar de termos obtido 3 extratos de FEs com atividade antifúngica contra as espécies de *Cryptococcus*, com porcentagens de inibição acima de 75,0 %, somente o extrato obtido a partir do FE UFMGCB 2032 apresentou atividade antifúngica constante

após sucessivos re-cultivos (n = 3), o que pode ser indício de que no metabolismo deste fungo a(s) substância(s) ativa(s) produzida(s) seja(m) constitutiva(s). Hertweck (2009) e Brakhage, Schroeckh (2011) propuseram uma justificativa para a perda da capacidade de produzir metabólitos secundários. Estes autores mostraram que os genes relacionados com a biossíntese de metabólitos estão agrupados e que são silenciados sob as condições padronizadas de laboratório, o que pode ter acontecido com os demais extratos ativos no teste de triagem.

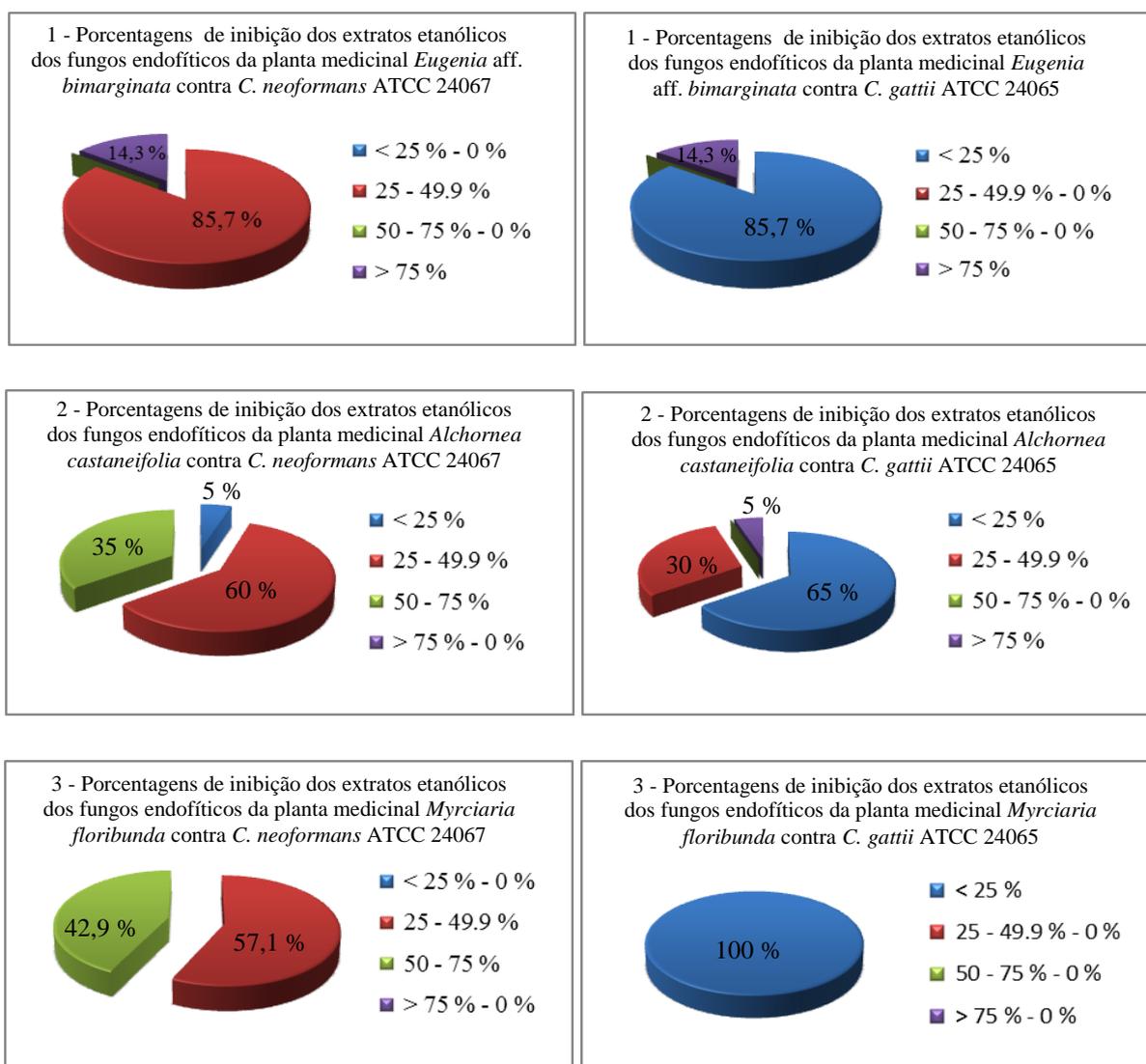


Fig. 8 – Gráficos das faixas de porcentagens de inibição encontrados para os extratos de fungos endofíticos das plantas medicinais testados contra as espécies de *C. neoformans* ATCC 24067 e *C. gattii* ATCC 24065 a 500 µg/mL. Plantas medicinais estudadas: *Eugenia aff. bimarginata* (1), *Alchornea castaneifolia* (2) e *Myrciaria floribunda* (3).

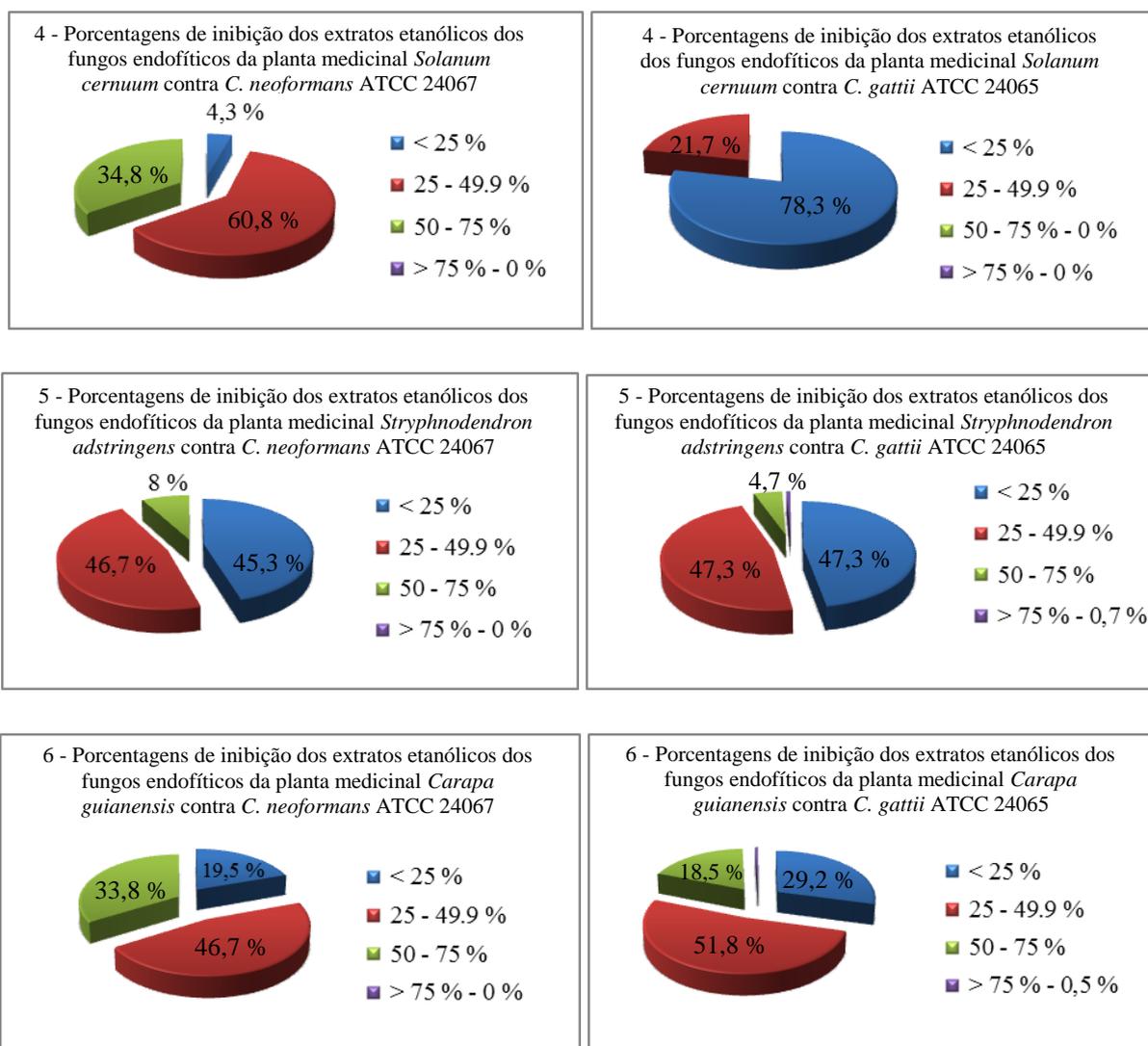


Fig. 9 – Gráficos das faixas de porcentagens de inibição encontrados para os extratos de fungos endofíticos das plantas medicinais testados contra as espécies de *C. neoformans* ATCC 24067 e *C. gattii* ATCC 24065 a 500 µg/mL. Plantas medicinais estudadas: *Solanum cernuum* (4), *Stryphnodendron adstringens* (5) e *Carapa guianensis* (6).

6.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos fungos endofíticos ativos

Na triagem, os extratos brutos dos FEs UFMGCB 4963 e UFMGCB 5155 tiveram valores de CIMs de 500 µg/mL frente às leveduras de *C. gattii*. A atividade antifúngica contra as duas leveduras de *Cryptococcus* foi encontrado somente para o FE UFMGCB 2032 que

teve CIM de 31,25 µg/mL para *C. neoformans* e CIM de 7,8 µg/mL para *C. gattii*. Nas Figuras 10 e 11 observa-se as fotos dos ensaios com os extratos do FE UFMGCB 2032.

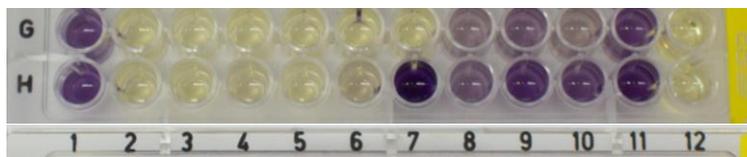


Fig. 10 – Placa de microdiluição com teste para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) frente *C. neoformans* ATCC 24067. Os poços das linhas G e H entre as colunas 2 a 11 contêm concentrações decrescentes do extrato do fungo endofítico 2032 (500 a 0,97 µg/mL). Os poços das colunas 1 (G e H) e 12 (G e H) são os controles de crescimento da levedura e do antifúngico, respectivamente. A CIM corresponde aos poços da coluna 6 com extrato bruto do fungo endofítico UFMGCB 2032 a 31,25 µg/mL.

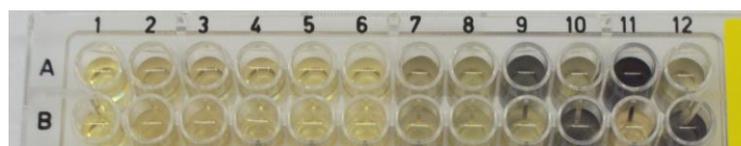


Fig. 11 – Placa de microdiluição com teste para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) frente *C. gattii* ATCC 24065. Os poços das linhas A e B entre as colunas 2 a 11 contêm concentrações decrescentes do extrato do fungo endofítico UFMGCB 2032 (500 a 0,97 µg/mL). Os poços das colunas 1 (A e B) e 12 (A e B) são os controles de esterilidade do meio e do diluente dos extratos (dimetilsulfóxido), respectivamente. A CIM corresponde aos poços da coluna 8 com extrato bruto do fungo endofítico UFMGCB 2032 a 7,80 µg/mL.

A literatura descreve que plantas medicinais do gênero *Eugenia* (*Myrtaceae*) têm propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antifúngica contra *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. (LAGO et al., 2011 e STEFANELLO et al., 2011). Costa et al. (2008) também já descreveram a atividade antifúngica contra espécies de *Candida*, *Microsporium* e *Trichophyton* em plantas do cerrado [*Alchornea castaneifolia* (Wild.) A. Juss., *Curatella americana* Linn., *Hancornia speciosa* Gomez, *Qualea grandiflora* Mart. e *Virola surinamensis* (Rol.) Warb.]. Esse foi o mesmo local de origem da planta da qual isolou-se o FE UFMGCB 2032 com atividade contra as espécies de *Cryptococcus* estudadas.

Os trabalhos avaliando extrato de FE contra as espécies de *Cryptococcus* são escassos. Os ensaios de microdiluição para avaliação da atividade antifúngica de extratos de FE já foram realizados pelos seguintes autores: Phongpaichit et al. (2006) mostraram que 18,0 % dos extratos brutos em acetato de etila de FEs das espécies de *Garcinia* foram ativos contra *C. neoformans* ATCC 90112 (CIMs de 64 µg/mL). Guo et al. (2008) avaliaram o extrato em éter etílico do fungo endofítico *C. fusiforme* contra *C. neoformans* ATCC 32609 e encontraram CI₈₀ de 32 µg/mL. Xu et al. (2009) avaliaram o extrato em éter etílico do fungo endofítico *Paecilomyce* sp. contra *C. neoformans* e encontraram CI₈₀ para o extrato de 1,0 µg/ mL.

Nesta revisão de literatura foram encontrados poucos trabalhos de triagem de atividade antifúngica com extratos de FE contra as leveduras de *C. neoformans*, não encontramos ensaios de bioprospecção utilizando como alvo biológico isolados de *C. gattii*, e também não foram encontrados trabalhos que avaliam extratos de FEs isolados de plantas de biomas brasileiros contra as duas espécies de *Cryptococcus*.

6.3 Identificação do fungo endofítico ativo UFMGCB 2032

A identificação do fungo endofítico ativo foi realizado por colaboradores do trabalho. O sequenciamento da região ITS do gene rRNA do FE UFMGCB 2032 produziu sequência com 458 pares que permitiu a identificação do FE ao nível de gênero – *Mycosphaerella*. A sequência consenso foi depositada no GeneBank sob o número de acesso KF681521. A sequência de nucleotídeos do isolado UFMGCB 2032 foi comparada com sequências depositadas no Genebank e não foram encontradas 100 % de identidade e 100% de cobertura com nenhuma sequência depositada. Os resultados indicam 99 % de identidade e 100 % de cobertura com as sequências dos isolados denominados ‘Uncultured endophytic’ (clones T111 e T89). A sequência do FE UFMGCB 2032 também apresentou 99 % de identidade e 98 % de cobertura com sequências dos fungos do gênero *Mycosphaerella* (*Mycosphaerella* isolado M17, *M. nawae* MY3, *M. nawae* MY2, *M. ellipsoidea* isolado 3234 e *M. scytalidii* isolados PM01 e UY1156). Sequências de outras espécies pertencentes ao gênero *Mycosphaerella* geradas em estudos anteriores e disponíveis no Genebank foram incluídas nas análises (TABELA 4).

Tabela 4. Fungos dos gêneros *Mycosphaerella*, *Passalora* e *Botryosphaeria* comparados ao FE *Mycosphaerella* spp. UFMGCB 2032, código da sequência ITS no Genebank, autores e ano da publicação (CROUS et al., 2006).

Fungos	Código da sequência ITS no Genebank	Autores	Ano
<i>M. scytalidii</i> CBS 516.93	DQ 303014	Crous et al.	2006
<i>M. scytalidii</i> CPC 10988	DQ 303015	Crous et al.	2006
<i>M. scytalidii</i> CPC 10998	DQ 303016	Crous et al.	2006
<i>Mycosphaerella</i> spp. CPC 10986	DQ 303037	Crous et al.	2006
<i>Mycosphaerella</i> spp. CPC 11002	DQ 303038	Crous et al.	2006
<i>M. stramentii</i> CPC 11545T	DQ 303042	Crous; Alfenas,	2004
<i>M. endophytica</i> CBS 114662T	DQ 302953	Crous et al.	2006
<i>M. gregaria</i> AY509757R	AY509757R	Maxwell et al.	2005
<i>M. gregaria</i> AY509755R	AY509755R	Maxwell et al.	2005
<i>M. endophytica</i> CBS 111519	DQ 302952	Crous et al.	2006
Uncultured endophytic fungus clone T111	KC978081	Yang; Xiong; Wang,	NP
<i>Mycosphaerella</i> spp. CBS 110991	DQ 303035	Crous et al.	2006
<i>Passalora zambiae</i> CBS 112971T	EU019273	Crous et al.	2007
<i>Passalora zambiae</i> CBS 112970T	EU019272	Crous et al.	2007
<i>Botryosphaeria obtusa</i> CBS119049	DQ458889	Alves, A., Correia, A. and Phillips, A.J.L.	2006
<i>Botryosphaeria parva</i>	AY343467R	Van Niekerk et al.	2004
NP – trabalho não publicado			

As sequências obtidas no GeneBank foram submetidas a inferência filogenética e estimadas usando o programa MEGA versão 5.22 (TAMURA et al., 2011). O alinhamento das

sequências foi realizado utilizando o programa MEGA e o algoritmo MUSCLE (EDGAR 2004a; EDGAR 2004b) com ajustes manuais para a melhoria visual onde necessário. As análises filogenéticas das sequências alinhadas foram realizadas por meio do método de máxima verossimilhança. Os parâmetros iniciais para cada conjunto de dados foram estimados pelo AIC (Akaike Information Criterion). O modelo “General Time Reversible” (GTR) foi o selecionado. A forma da distribuição gama (G), a proporção de sítios invariáveis (I) e os valores dos parâmetros de substituição nucleotídica foram estimados. A confiabilidade da árvore de máxima verossimilhança gerada foi avaliada por meio de 1000 repetições *bootstrap* e a árvore foi construída utilizando dois isolados dos gêneros *Passalora* e *Botryosphaeria* (FIGURA 12).

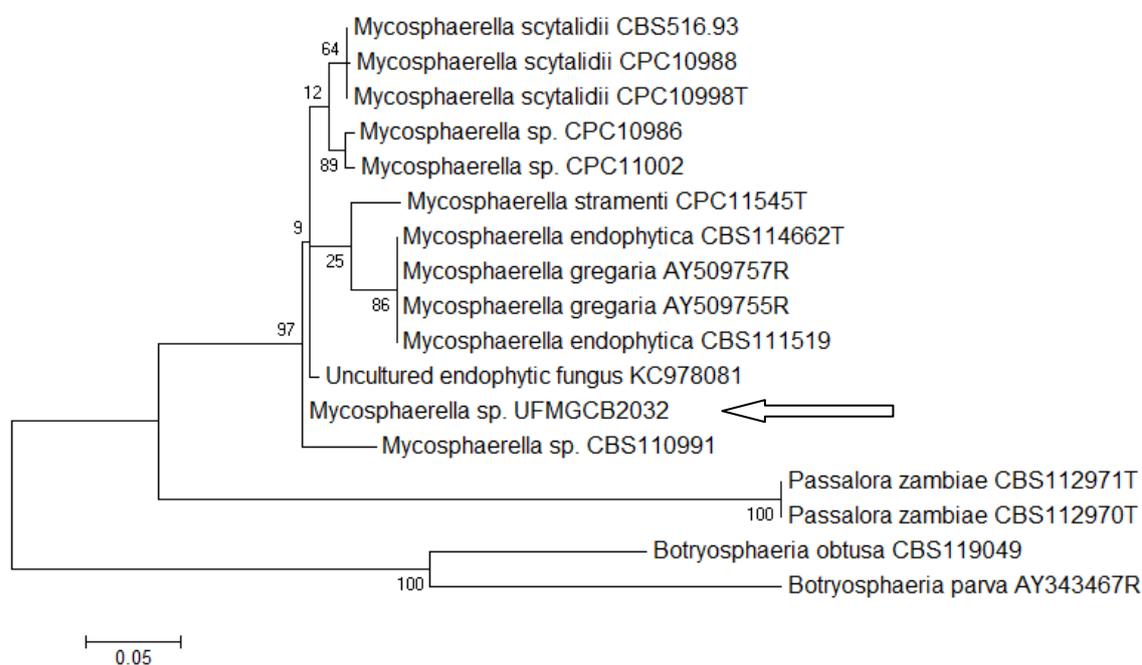


Fig. 12 – Árvore filogenética de máxima verossimilhança do FE *Mycosphaerella* spp. UFMGCB 2032 após sequenciamento da região ITS do RNA ribossomal e comparação com sequências de outras espécies pertencentes ao gênero *Mycosphaerella* através do programa MEGA. Os números nos nós indicam o suporte de “bootstrap” para 1.000 replicatas. A árvore foi construída utilizando dois isolados dos gêneros *Passalora* e *Botryosphaeria*.

Para identificação até nível de espécie, o FE *Mycosphaerella* spp. UFMGCB 2032 também foi sequenciado com os primers dos genes da β -tubulina e do fator de alongação. Porém, as sequências obtidas tiveram baixa qualidade e não foi possível comparar com sequências depositadas no GeneBank.

A identificação molecular seria complementada pela avaliação morfológica dos esporos, porém os microcultivos realizados em diferentes meios de cultivo e sob diferentes condições de temperatura, não foram capazes de induzir a esporulação do FE UFMGCB 2032.

O gênero *Mycosphaerella* Johanson abrange mais de 2.000 espécies (CORLETT, 1991) e diversas delas são produtoras de metabólitos secundários. Em conformidade com os relatos da literatura listados na Tabela 5 para diversas espécies de *Mycosphaerella*. O isolado de *Mycosphaerella* spp. UFMGCB 2032 também foi capaz de produzir substâncias ativas contra as duas espécies de *Cryptococcus* estudadas, o que justificou seu cultivo em larga escala para isolamento e caracterização de seus metabólitos ativos.

Tabela 5. Metabólitos secundários produzidos pelo gênero *Mycosphaerella*, alvos biológicos, autor e ano.

<i>Mycosphaerella</i>	Alvos biológicos	Metabólito secundário	Autor	Ano
<i>M. rosigena</i>	N.A.	Micromona e Micoxantona	Assante et al.,	1979
<i>M. rosigena</i>	N.A.	Rosigenina	Albinati et al.,	1980
<i>M. ligulicola</i>	N.A.	3-metilideno-6-metóxi-1,4-benzodioxan-2-ona e ácido 2-(2-hidroxi-5-metóxi-fenoxil)-acrílico	Assante et al.,	1981
<i>M. rubella</i>	N.A.	Rubelinas A e B (antraquinonas)	Arnone et al.,	1986
<i>M. rubella</i>	N.A.	1,8-diidroxi-2-metóxi-6-metil-12H-fenantro[12,14-bcd]piran-9,10,12-triona	Arnone; Nasini; Pava,	1991
<i>M. asteroma</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>Ustilago maydis</i> , <i>Ophiostoma ulmi</i> e <i>Geotrichum candidum</i>	Asteromina (6,6'-binafto- α -pirona)	Arnone et al.,	1995
<i>M. rubella</i>	<i>B. subtilis</i> e <i>B. cereus</i>	Ácido 6,13-dihidróxitetradeca-2,4,8-trienóico	Arnone; Nasini; Pava,	1998
<i>Mycosphaerella</i> sp. isolado F2140	<i>Leishmania donovani</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i> , <i>Plasmodium falciparum</i>	Cercosporina e análogos	Moreno et al.,	2011

N.A – não avaliada.

6.4 Estudo químico biomonitorado do fungo endofítico UFMGCB 2032 para atividade antifúngica

A primeira estratégia de estudo do FE UFMGCB 2032, realizado para isolamento das substâncias ativas, foi inicialmente executado fazendo-se o cultivo em larga escala, seguido da obtenção de frações brutas por partição líquido-líquido do extrato etanólico bruto com solventes orgânicos (hexano, diclorometano, acetato de etila e água), e por fim, o fracionamento cromatográfico da fração solúvel em acetato de etila, com menores valores de CIM, em três etapas: 1 - cromatografia em coluna de sílica gel, 2 - coluna com octadecilsilano eluída a média pressão e 3 - CLAE em escala semi-preparativa. Contudo, esta estratégia não permitiu isolar quantidade significativa de substâncias para a etapa de identificação, e por isso, foi realizado um segundo cultivo em larga escala do FE UFMGCB 2032, e adotada nova estratégia de fracionamento baseada nas informações e conhecimentos adquiridos na primeira fase do estudo.

O estudo químico do extrato do FE *Mycosphaerella* spp. UFMGCB 2032 foi iniciado pelo seu cultivo em larga escala em meio BDA, seguido da extração do micélio e do meio BDA em acetato de etila (realizadas separadamente), obtenção das frações brutas do micélio e do meio BDA por partição líquido-líquido do extrato bruto etanólico com solventes orgânicos (hexano, diclorometano, acetato de etila e água), e por fim, o fracionamento biomonitorado da fração mais ativa até isolamento das substâncias. As estruturas químicas das substâncias isoladas foram identificadas e as mesmas foram avaliadas frente à diferentes alvos biológicos. Posteriormente, foi realizado o estudo das alterações morfológicas das substâncias sobre a célula fúngica e a investigação do tipo de interação destas com os antifúngicos mais empregados no tratamento da criptococose.

6.4.1 Cultivo, extração em larga escala do FE UFMGCB 2032, partição líquido-líquido e avaliação da atividade antifúngica das frações brutas

O cultivo em larga escala do FE UFMGCB 2032 foi realizado em placas de Petri contendo meio BDA porque o FE UFMGCB 2032 não cresceu em meio líquido (Caldo GYMP). As características macroscópicas do fungo endofítico UFMGCB 2032, após 15 dias de cultivo a 25°C em meio BDA para obtenção do extrato bruto em larga escala, podem ser observadas na Figura 13. Após incubação, o FE *Mycosphaerella* spp. UFMGCB 2032 formou

colônias verdes acinzentadas (vista frontal), e fundo de coloração verde oliva, com pregas longitudinais e bordas brancas. Estas características macroscópicas das colônias são semelhantes às descrições do isolado de *Mycosphaerella scytalidii* CBS 516.93 após seu cultivo em meio BDA (CROUS et al., 2006).



Fig. 13 – Placa de cultivo do fungo endofítico UFMGCB 2032 após 15 dias de incubação a 25°C em agar batata dextrose. À esquerda; vista do fundo (colônia verde oliva com pregas longitudinais e bordas brancas) e à direita; vista de frente (colônias verdes acinzentadas).

O micélio do FE *Mycosphaerella* spp. UFMGCB 2032, após cultivo em larga escala e separação do meio BDA, originou um extrato bruto de massa 8,0 g que teve valor de CIM de 31,2 µg/mL frente à *C. neoformans* e 7,8 µg/mL frente à *C. gattii*. O extrato bruto do meio BDA originou um extrato bruto de 1,0 g que teve valor de CIM semelhante aos valores encontrados para o extrato bruto do micélio.

A partição líquido-líquido do extrato do micélio originou três frações: Hex (4,1 g), DCM (1,4 g), AcOEt (1,3 g). A partição do extrato do meio BDA produziu três frações: Hex (84,1 mg), DCM (98,8 mg), AcOEt (112,0 mg).

6.4.2 Fracionamento 1 por CLAE em escala semi-preparativa e avaliação da atividade antifúngica dos grupos de frações

O primeiro fracionamento cromatográfico foi realizado com as duas frações solúveis em acetato de etila por partição líquido-líquido obtidas do micélio e do meio BDA. Uma porção total de 1,27 g (1,16 g da fração AcOEt obtida do micélio e outra de 0,11 g da fração

AcOEt obtida do meio BDA), foram preparadas conforme item 5.6.3.3. Aproximadamente 0,8 g da fração AcOEt obtida do micélio foi injetada no CLAE (dividido em 9 injeções) que originou 44 frações coletadas conforme o tempo de retenção dos picos eluídos e representados no cromatograma da Figura 14. Aproximadamente 88 mg da fração AcOEt do meio BDA foi injetada no CLAE (uma injeção) e originou 44 frações com perfil cromatográfico semelhante ao perfil obtido a partir do micélio (FIGURA 15).

Alíquotas das 44 frações obtidas da fração solúvel em AcOEt (oriundas do micélio) e alíquotas das frações obtidas da fração solúvel em AcOEt (oriundas do meio BDA), e que possuíram massa acima de 3,0 mg, foram submetidas ao ensaio para avaliação da atividade antifúngica frente às duas espécies de *Cryptococcus*. As frações foram testadas na concentração de 250 µg/mL, conforme descrito no ensaio de triagem do item 5.5.3. Foram encontradas 25 frações ativas contra as duas espécies de *Cryptococcus* que eluíram da coluna realizada em CLAE escala semi-preparativa entre 39 e 50 min após o fracionamento 1.

Após resultados dos ensaios biológicos e perfil das substâncias obtidas por CCD, as 44 frações obtidas a partir do micélio e do meio BDA, foram reunidas em 28 grupos (A001.1 a A001.28), sendo 21 ativos contra as leveduras e 6 deles com massa igual ou superior 35,0 mg (A001.9 a A001.14). A massa dos grupos de frações e os resultados dos ensaios da atividade antifúngica estão na Tabela 6.

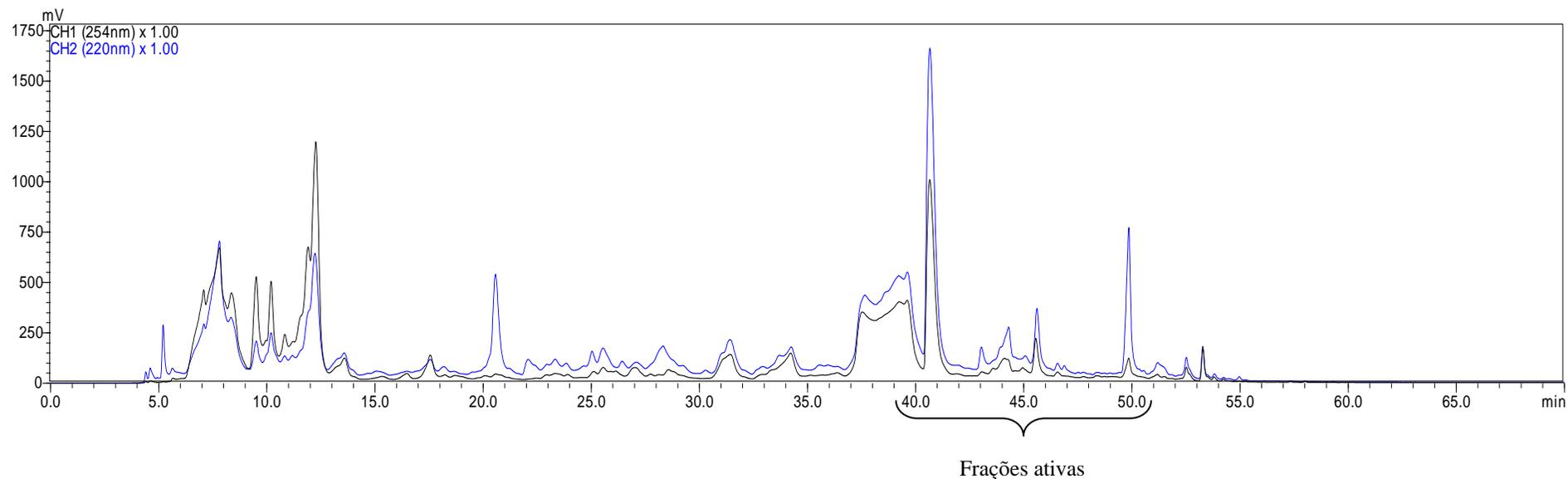


Fig. 14 – Perfil cromatográfico do fracionamento 1 em CLAE em escala semi-preparativa da fração solúvel em AcOEt obtida do micélio do FE *Mycosphaerella* spp. UFMGCB 2032. A fração solúvel em AcOEt obtida a partir do micélio foi eluída com gradiente de MeOH: H₂O Milli-Q (10-50% MeOH até 30 min.; 50-95% até 50 min. 95-100 % até 51 min. e 100 % em 68 min.) e fluxo de 8,0 mL/min. Linha azul representa a absorbância medida em 220 nm e a linha preta a absorbância medida em 254 nm. A chave marca o intervalo de tempo (entre 39 e 51 min.) no qual eluíram as frações contendo substâncias ativas e de massa superior a 35,0 mg (A001.9-A001.14).

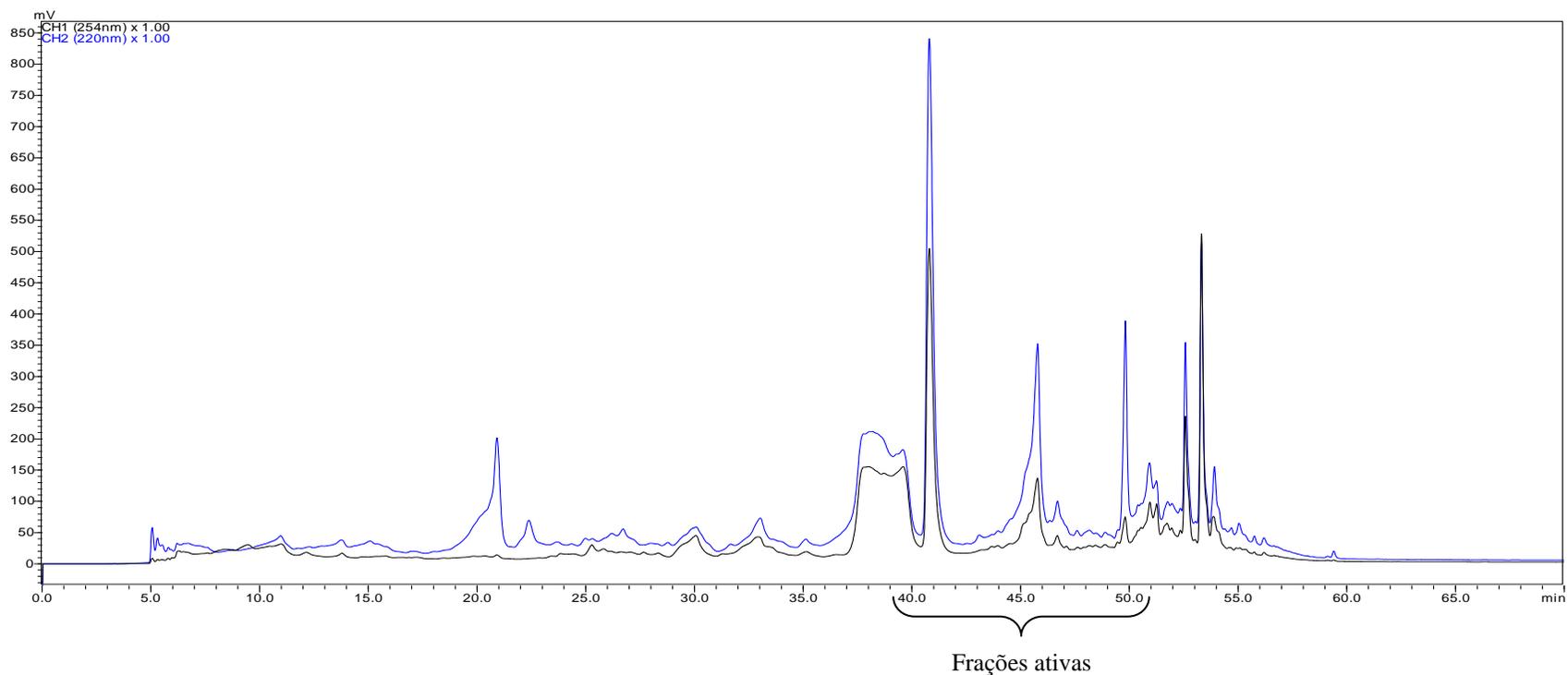


Fig. 15 – Perfil cromatográfico do fracionamento 1 em CLAE em escala semi-preparativa da fração solúvel em AcOEt obtida do meio BDA do FE *Mycosphaerella* spp. UFMGCB 2032. A fração solúvel em AcOEt obtida a partir do micélio foi eluída com gradiente de MeOH: H₂O Mili-Q (10-50% MeOH até 30 min.; 50-95% até 50 min. 95-100 % até 51 min. e 100 % em 68 min.) e fluxo de 8,0 mL/min. Linha azul representa a absorbância medida em 220 nm e a linha preta a absorbância medida em 254 nm. A chave marca o intervalo de tempo (entre 39 e 51 min.) no qual eluíram as frações contendo substâncias ativas e de massa superior a 35,0 mg (A001.9-A001.14).

Tabela 6 – Resultado do fracionamento 1 da fração AcOEt do FE *Mycosphaerella* spp. UFMGCB 2032 por CLAE em escala semi-preparativa. Massas dos grupos de frações e resultados dos ensaios de atividade antifúngica realizados por microdiluição na concentração de 250 µg/mL frente às duas espécies de *Cryptococcus*.

Grupo	Massa (mg)	Bioativo	Grupo	Massa (mg)	Bioativo
A.001.1	5,8	<i>Sim</i>	A.001.15	23,9	<i>Sim</i>
A.001.2	262,9	Não	A.001.16	14,5	<i>Sim</i>
A.001.3	25,6	<i>Sim</i>	A.001.17	6,6	<i>Sim</i>
A.001.4	39,6	Não	A.001.18	3,8	<i>Sim</i>
A.001.5	8,8	<i>Sim</i>	A.001.19	2,7	<i>Sim</i>
A.001.6	43,9	Não	A.001.20	0,7	<i>Sim</i>
A.001.7	10,8	<i>Sim</i>	A.001.21	24,4	<i>Sim</i>
A.001.8	7,7	Não	A.001.22	7,7	Não
A.001.9	39,6	<i>Sim</i>	A.001.23	0,2	<i>Sim</i>
A.001.10	52,5	<i>Sim</i>	A.001.24	12,5	Não
A.001.11	44,8	<i>Sim</i>	A.001.25	1,0	<i>Sim</i>
A.001.12	46,9	<i>Sim</i>	A.001.26	6,4	Não
A.001.13	41,3	<i>Sim</i>	A.001.27	5,0	<i>Sim</i>
A.001.14	58,6	<i>Sim</i>	A.001.28	14,4	<i>Sim</i>

Sim – ativo contra as duas leveduras após ensaio de microdiluição a 250 µg/mL e com porcentagem de inibição acima de 90,0%.

Não – sem atividade contra as leveduras.

6.4.3 Fracionamento e avaliação da atividade antifúngica das sub-frações A001.9 a A001.14

O fracionamento foi realizado por fase reversa utilizando CLAE em escala semi-preparativa com as 6 frações ativas e de massa igual ou superior 35,0 mg (A001.09 a A001.14). Os perfis cromatográficos estão nas Figuras 16 a 21. O número de sub-frações obtidas, as sub-frações com massa superior a 4,0 mg e os valores de CIM frente as duas leveduras de *Cryptococcus* estão na Tabela 7.

As sub-frações foram analisadas qualitativamente quanto à pureza por CCD (FIGURA 22). As sub-frações com menores valores de CIMs e que na CCD apresentaram poucas manchas foram avaliadas quanto à pureza por CLAE em escala analítica.

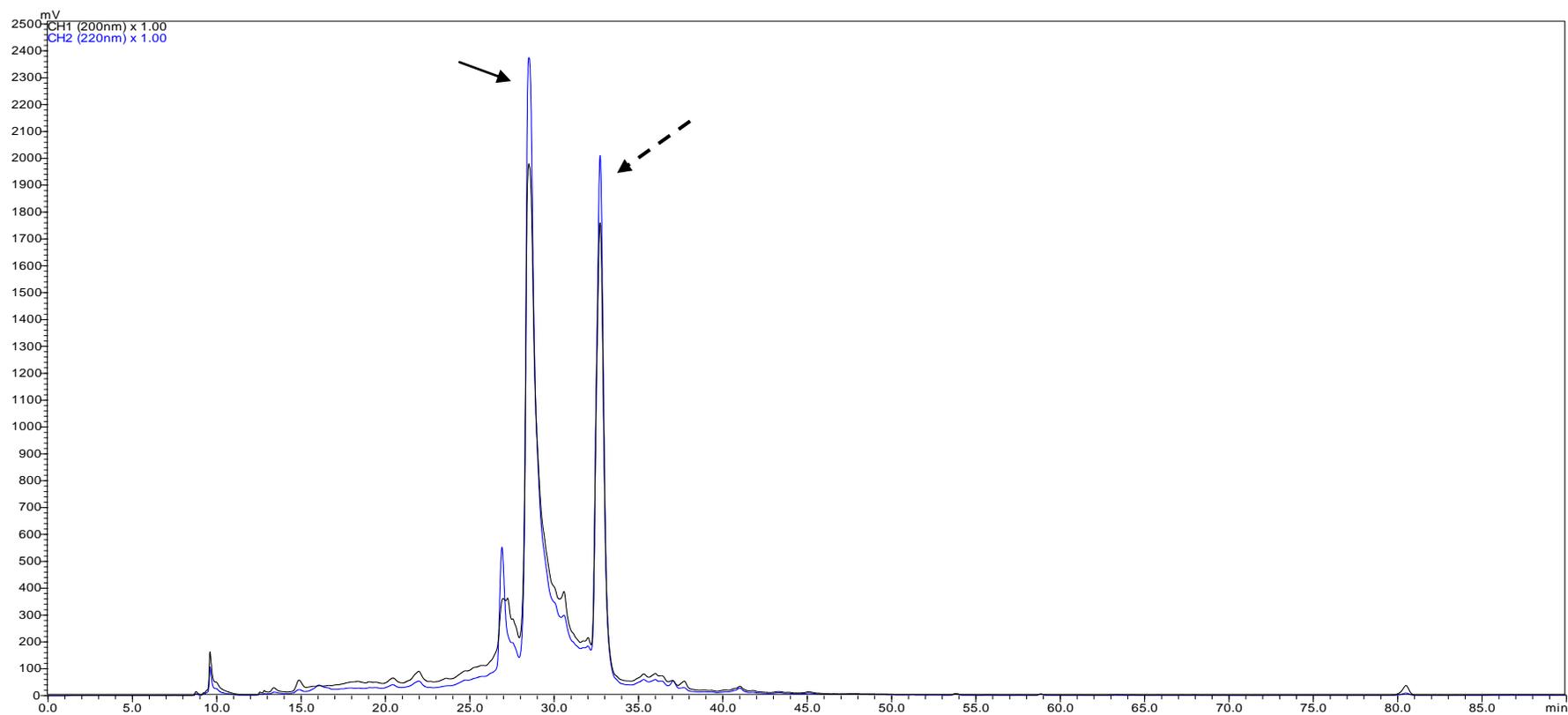


Fig. 16 – Perfil cromatográfico da fração A001.9 obtida da fração solúvel em AcOEt do FE *Mycosphaerella* spp. UFMGCB 2032, fracionada em CLAE em escala semi-preparativa. A fração foi eluída com gradiente de acetonitrila (ACN) e H₂O (30% ACN até 10 min.; 30-50% até 24 min.; 50-75% até 50 min.; 75-100% até 60 min. e 100% em 90 min.) e fluxo de 8,0 mL/min. Linha azul representa a absorbância medida em 220 nm e a linha preta a absorbância medida em 200 nm. A seta cheia indica o pico da sub-fração ativa A001.9.17 de massa 14,5 mg que eluiu da coluna entre 28,1-30,1 minutos, e a seta pontilhada indica o pico da sub-fração ativa A001.9.19 de massa 6,7 mg que eluiu da coluna entre 32,4-34,5 minutos.

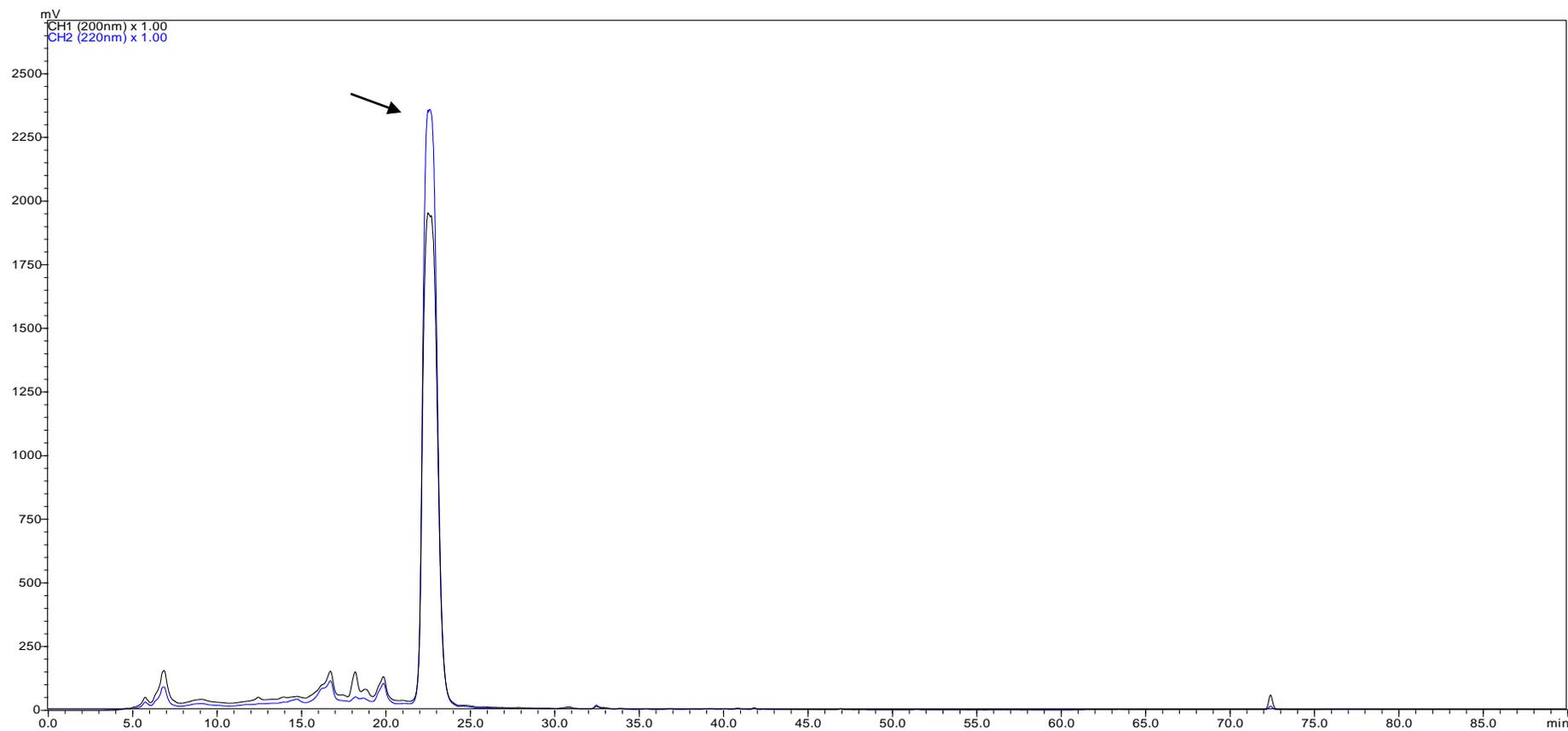


Fig. 17 – Perfil cromatográfico da fração A001.10 obtida da fração solúvel em AcOEt do FE *Mycosphaerella* spp. UFMGCB 2032, fracionada em CLAE em escala semi-preparativa. A fração foi eluída com gradiente de acetonitrila (ACN) e H₂O (30% ACN até 10 min.; 30-50% até 24 min.; 50-75% até 50 min.; 75-100% até 60 min. e 100% em 90 min.) e fluxo de 8,0 mL/min. Linha azul representa a absorvância medida em 220 nm e a linha preta a absorvância medida em 200 nm. A seta cheia indica o pico da sub-fração ativa A001.10.16 de massa 10,6 mg que eluiu da coluna entre 21,7-22,8 minutos.

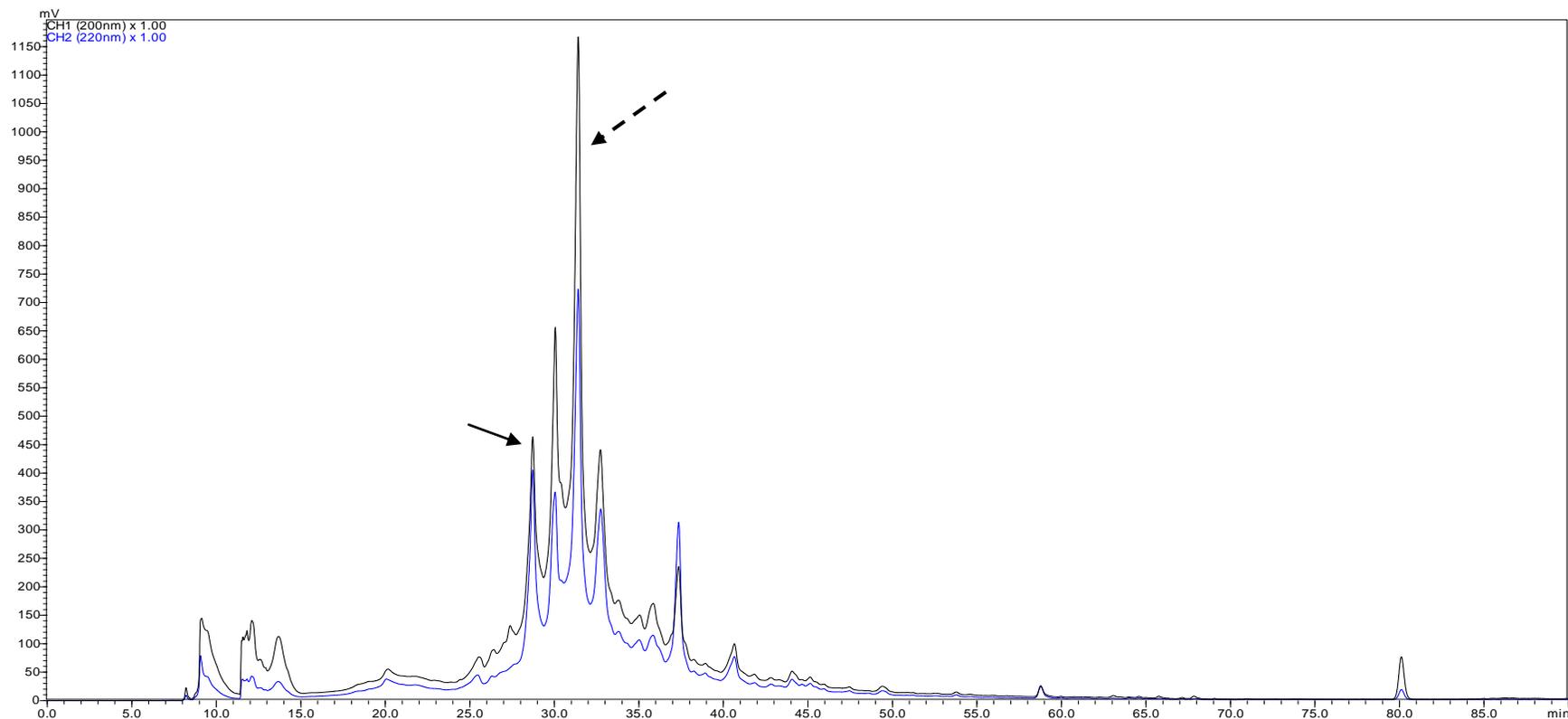


Fig. 18 – Perfil cromatográfico da fração A001.11 obtida da fração solúvel em AcOEt do FE *Mycosphaerella* spp. UFMGCB 2032, fracionada em CLAE em escala semi-preparativa. A fração foi eluída com gradiente de acetonitrila (ACN) e H₂O (30% ACN até 10 min.; 30-50% até 24 min.; 50-75% até 50 min.; 75-100% até 60 min. e 100% em 90 min.) e fluxo de 8,0 mL/min. Linha azul representa a absorbância medida em 220 nm e a linha preta a absorbância medida em 200 nm. A seta cheia indica o pico da sub-fração ativa A001.11.15 de massa 4,0 mg que eluiu da coluna entre 28,5-29,7 minutos, e a seta pontilhada indica o pico da sub-fração ativa A001.11.18 de massa 5,3 mg que eluiu da coluna entre 31,1-32,5 minutos.

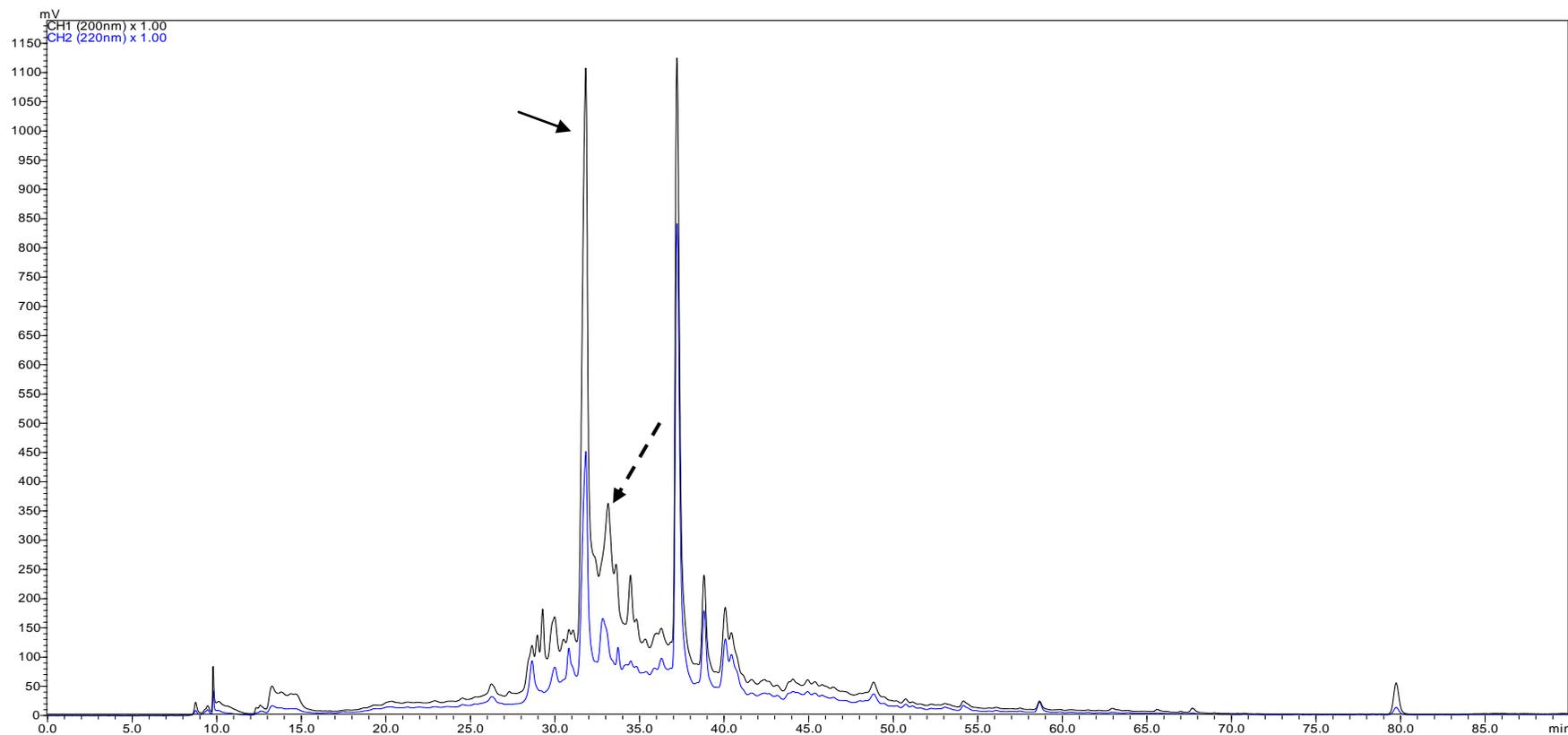


Fig. 19 – Perfil cromatográfico da fração A001.12 obtida da fração solúvel em AcOEt do FE *Mycosphaerella* spp. UFMGCB 2032, fracionada em CLAE em escala semi-preparativa. A fração foi eluída com gradiente de acetonitrila (ACN) e H₂O (30% ACN até 10 min.; 30-50% até 24 min.; 50-75% até 50 min.; 75-100% até 60 min. e 100% em 90 min.) e fluxo de 8,0 mL/min. Linha azul representa a absorvância medida em 220 nm e a linha preta a absorvância medida em 200 nm. A seta cheia indica o pico da sub-fração ativa A001.12.27 de massa 5,0 mg que eluiu da coluna entre 31,5-32,5 minutos, e a seta pontilhada indica o pico da sub-fração ativa A001.12.29 de massa 5,9 mg que eluiu da coluna entre 32,8-33,8 minutos.

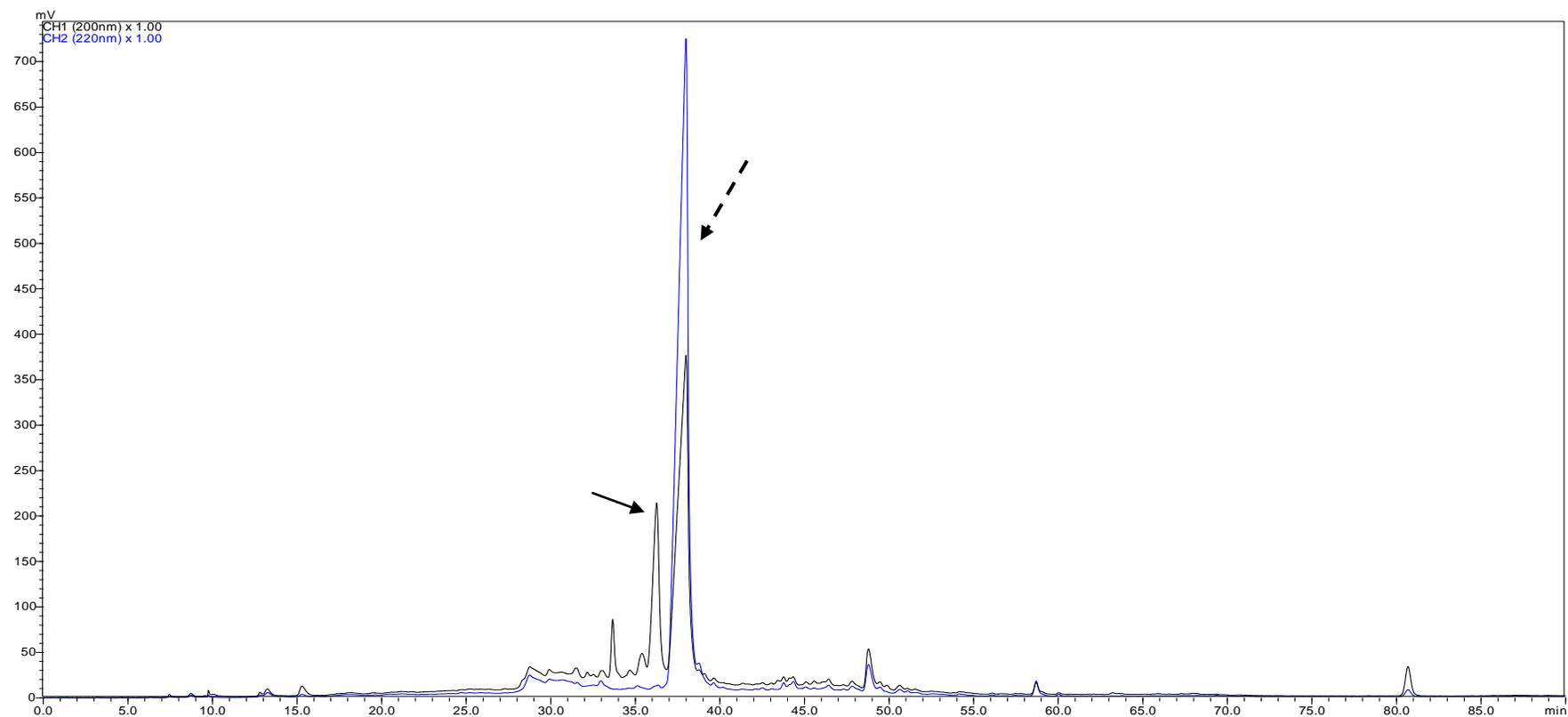


Fig. 20 – Perfil cromatográfico da fração A001.13 obtida da fração solúvel em AcOEt do FE *Mycosphaerella* spp. UFMGCB 2032, fracionada em CLAE em escala semi-preparativa. A fração foi eluída com gradiente de acetonitrila (ACN) e H₂O (30% ACN até 10 min.; 30-50% até 24 min.; 50-75% até 50 min.; 75-100% até 60 min. e 100% em 90 min.) e fluxo de 8,0 mL/min. Linha azul representa a absorvância medida em 220 nm e a linha preta a absorvância medida em 200 nm. A seta cheia indica o pico da sub-fração ativa A001.13.26 de massa 7,4 mg que eluiu da coluna entre 36,0-37,4 minutos, e a seta pontilhada indica o pico da sub-frações ativas A001.13.27 e 13.28 (com a mesma substância) de massa 12,3 mg que eluíram da coluna entre 37,4-38,9 minutos.

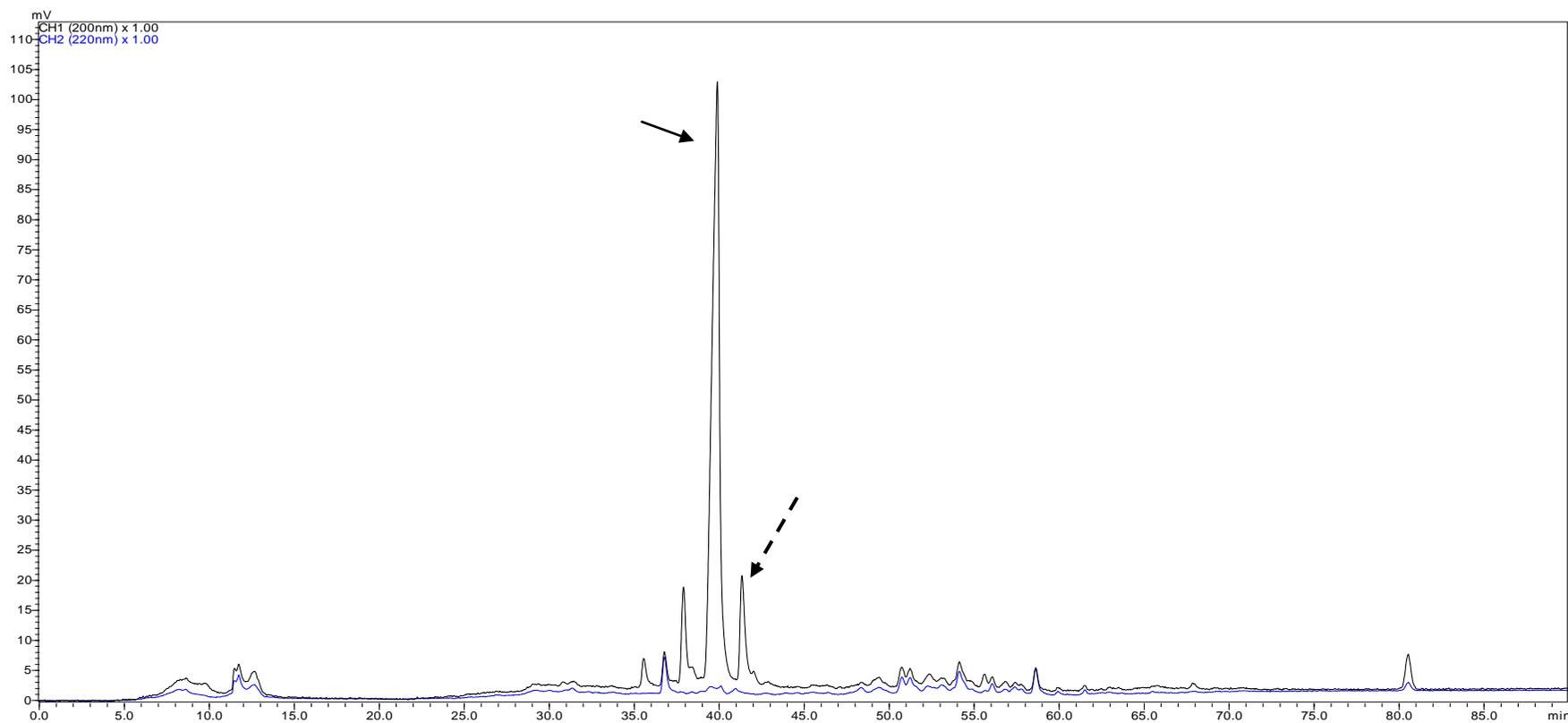


Fig. 21 – Perfil cromatográfico da fração A001.14 obtida da fração solúvel em AcOEt do FE *Mycosphaerella* spp. UFMGCB 2032, fracionada em CLAE em escala semi-preparativa. A fração foi eluída com gradiente de acetonitrila (ACN) e H₂O (30% ACN até 10 min.; 30-50% até 24 min.; 50-75% até 50 min.; 75-100% até 60 min. e 100% em 90 min.) e fluxo de 8,0 mL/min. Linha azul representa a absorvância medida em 220 nm e a linha preta a absorvância medida em 200 nm. A seta cheia indica o pico da sub-fração ativa A001.14.15 de massa 21,5 mg que eluiu da coluna entre 39,3-40,9 minutos, e a seta pontilhada indica o pico da sub-fração ativa A001.14.17 de massa 4,4 mg que eluiu da coluna entre 41,4-42,2 minutos.

Tabela 7 – Resultado do fracionamento das sub-frações A001.9 a A001.14 por CLAE em escala semi-preparativa. Número de sub-frações, sub-frações com massa superior a 4,00 mg e valores de CIMs obtidos por ensaios de microdiluição frente as espécies de *Cryptococcus*.

Grupo	Número de sub-frações	Sub-frações com massa $\geq 4,0$ mg	Massa (mg)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	
				<i>C. neoformans</i> ATCC 24067	<i>C. gattii</i> ATCC 24065
A.001.9	23	A.001.9.17	14,5	> 50,00	> 50,00
		A.001.9.19	6,7	> 50,00	> 50,00
A.001.10	25	A.001.10.16	10,6	50,00	50,00
		A.001.10.17	7,2	50,00	50,00
A.001.11	25	A.001.11.15	4,0	> 50,00	> 50,00
		A.001.11.18	5,3	25,00	25,00
A.001.12	40	A.001.12.27	5,0	> 50,00	> 50,00
		A.001.12.29	5,9	25,00	50,00
A.001.13	35	A.001.13.26	7,4	5,00	2,50
		A.001.13.27	7,9	1,25	2,50
		A.001.13.28	4,4	2,50	2,50
A.001.14	23	A.001.14.15	21,5	0,50	0,50
		A.001.14.17	4,4	2,50	2,50

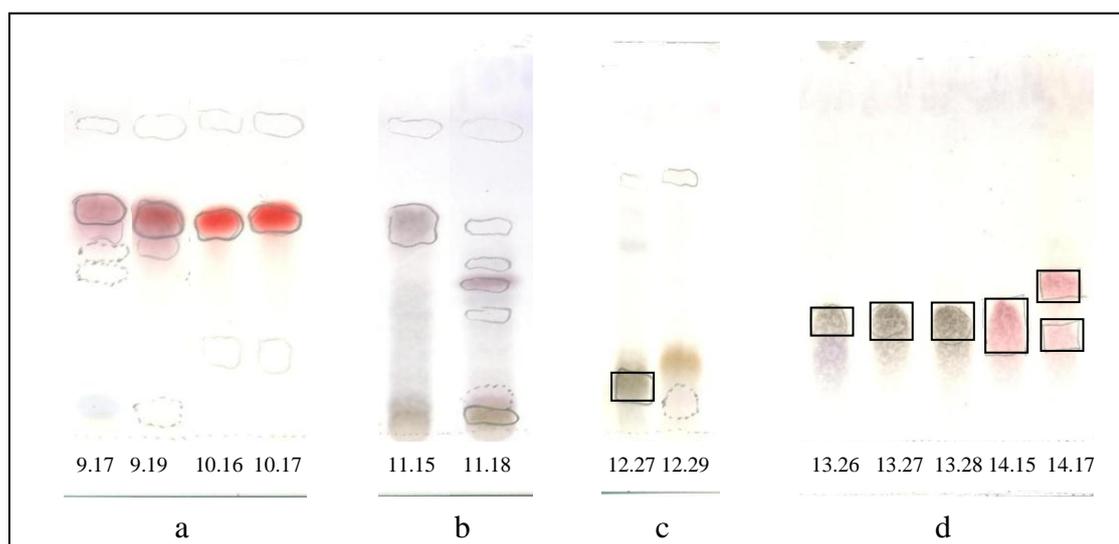


Fig. 22 – Perfil de substâncias oriundos das sub-frações com massa superior a 4,0 mg após análise por CCD. As CCDs foram eluídas com $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$ nas seguintes proporções: (a e b) 10:2,25:0,5; (c) 10:3,25:0,5 e (d) 10:4,5:0,5. Linha pontilhada: manchas fluorescentes em 254 nm, linha cheia: mancha fluorescente a 366 nm e retângulos: manchas reveladas com vapor de iodo. As manchas coloridas foram obtidas após revelação com mistura de vanilina/ H_2SO_4 e aquecimento.

6.4.4 Avaliação da pureza das sub-frações por CLAE em escala analítica

A avaliação da pureza por CLAE em escala analítica foi realizada com as sub-frações que apresentaram mancha única após análise por CCD (FIGURA 22), e que obtiveram os menores valores de CIMs contra as leveduras de *Cryptococcus* (A001.13.26, A001.13.27, A001.13.28, A001.14.15 e A001.14.17).

As sub-frações 13.26 e 14.17 apresentaram 2 picos no cromatograma, as sub-frações 13.27 e 13.28 foram reunidas porque apresentaram pico único no cromatograma com mesmo perfil e tempo de retenção, além disso elas formaram manchas iguais na CCD. A sub-fração 14.15 apresentou pico único no cromatograma confirmando o isolamento da substância (FIGURA 23).

A sub-fração 13.27 teve tempo de retenção de 18 min. e a sub-fração 14.15 de 19,3 minutos. O pico da sub-fração 14.15 foi observado somente a 200 nm.

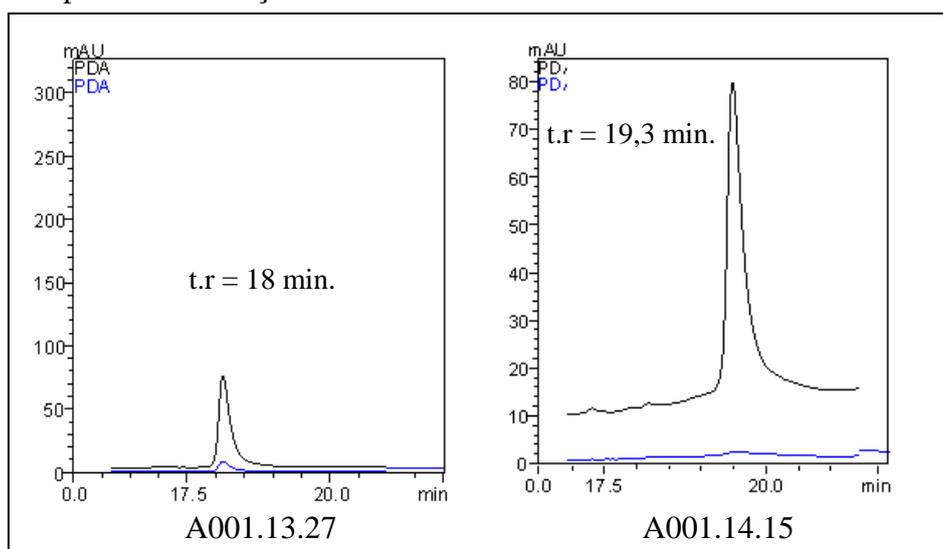


Fig. 23 – Perfil cromatográfico das sub-frações A001.13.27 e A001.14.15 obtidas no fracionamento 2 em CLAE em escala semi-preparativa. As frações foram eluídas com gradiente de acetonitrila (ACN) e H₂O Milli-Q (30% ACN até 5 min.; 30-50% até 12 min.; 50-75% até 25 min.; 75-100% até 30 min. e 100% até 45 min.) e fluxo de 1,0 mL/min. Linha azul representa a absorvância medida em 220 nm e a linha preta a absorvância medida em 200 nm.

O esquema geral dos fracionamentos até o isolamento das substâncias com os valores de CIM obtidos nas avaliações de atividade antifúngica contra *C. neoformans* (*C. n.*) e *C. gattii* (*C. g.*) estão resumidos na Figura 24.

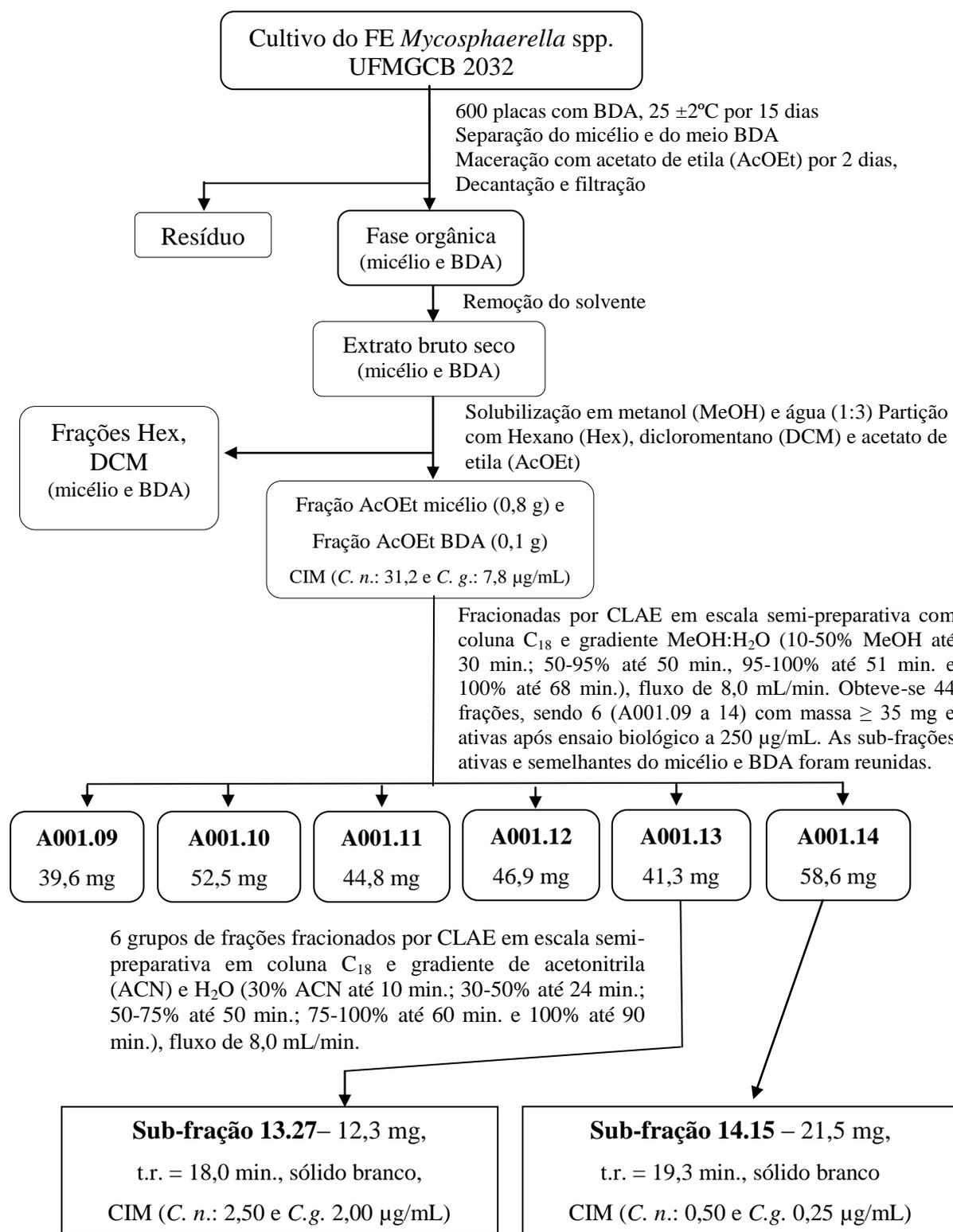


Fig. 24 - Esquema geral do fracionamento da fração AcOEt até isolamento das substâncias ativas. O fracionamento cromatográfico foi biomonitorado através de ensaios de microdiluição com *C. neoformans* ATCC 24067 (*C. n.*) e *C. gattii* ATCC 24065 (*C. g.*). CIM – Concentração inibitória mínima e t.r. – tempo de retenção das substâncias isoladas.

As substâncias isoladas, sub-frações A001.13.27 e A001.14.15, foram chamadas de substâncias **1** e **2**, respectivamente. Estas foram submetidas a análises físicas e químicas para identificação das substâncias como também ensaios biológicos frente à maior número de isolados de *Cryptococcus* e diferentes alvos biológicos (espécies de *Candida* e *Leishmania L. amazonensis*).

6.4.5 Identificação e caracterização das substâncias isoladas

Os deslocamentos químicos obtidos após análise dos espectros (1D e 2D) de ressonância magnética nuclear (RMN) estão na Tabela 8. As estruturas químicas foram elucidadas por colaboradores do trabalho (técnica do Laboratório de Métodos Analíticos da FARMANGUINHOS – FIOCRUZ – RJ).

Os espectros de massas (EM), espectro no U.V. e espectros obtidos por ressonância nuclear de ^1H e ^{13}C (RMN) das substâncias **1** e **2** encontram-se nas Figuras 25 e 26, respectivamente. Outros espectros de massas, RMN e os espectros ampliados das substâncias **1** e **2** encontram-se nos Anexos E (página 145) e F (página 168), respectivamente.

Tabela 8 – Atribuições dos sinais dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C para as substâncias **1** e **2** isoladas do FE *Mycosphaerella* spp. UFMGCB 2032.

Posição	Substância 1				Substância 2			
	$\delta^{13}\text{C}$ (DEPT)	$\delta^1\text{H}$ (J in Hz)	$^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY	HMBC	$\delta^{13}\text{C}$ (DEPT)	$\delta^1\text{H}$ (J in Hz)	$^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY	HMBC
1	169,9 (C)			H-2'	169,9 (C)			H-2', H-3
2	67,6 (C)			H-2', H-3	67,8 (C)			
3	69,3 (CH)	3,60 (<i>sl</i>)		H-5	69,3 (CH)	3,59 (<i>sl</i>)		
4	70,7 (CH)	3,65 (<i>t</i> , <i>J</i> 7,1)	H-5	H-5	70,7 (CH)	3,64 (<i>t</i> , <i>J</i> 7,5)		
5	37,5 (CH ₂)	2,11 (<i>q</i> , <i>J</i> 5,6)			37,5 (CH ₂)	2,11 (<i>q</i> , <i>J</i> 5,5)		
6	131,6 (CH)	5,39 (<i>dt</i> , <i>J</i> 15,4, 6,2)	H-5	H-8	131,9 (CH)	5,41 (<i>dt</i> , <i>J</i> 15,3, 6,5)	H-7	H-8
7	127,0 (CH)	5,40 (<i>dt</i> , <i>J</i> 15,4, 6,2)	H-8	H-8	126,7 (CH)	5,34 (<i>dt</i> , <i>J</i> 15,3, 6,5)		H-8
8	31,8 (CH ₂)	1,97 (<i>q</i> , <i>J</i> 6,8)		H-6, H-7	32,1 (CH ₂)	1,93 (<i>q</i> , <i>J</i> 6,7)		H-6, H-7
9	28,4 (CH ₂)	1,23 (<i>m</i>)		H-8, H-10	28,4 (CH ₂)	1,27-1,20 (<i>m</i>)		
10	27,0 (CH ₂)	1,42 (<i>m</i>)	H-11	H-11, H-17	28,2 (CH ₂)	1,27-1,20 (<i>m</i>)		
11	31,6 (CH ₂)	2,17 (<i>q</i> , <i>J</i> 6,8)	H-10	H-12, H-13	28,8 (CH ₂)	1,27-1,20 (<i>m</i>)		H-8
12	147,1 (CH)	6,83 (<i>dt</i> , <i>J</i> 15,9, 6,8)	H-13, H-11	H-11	23,2 (CH ₂)	1,44 (<i>qui</i> , <i>J</i> 7,1)		
13	130,2 (CH)	6,07 (<i>d</i> , <i>J</i> 15,9)	H-12	H-11	41,8 (CH ₂)	2,38 (<i>td</i> , <i>J</i> 7,3, 1,3)	H-12	
14	200,0 (C)			H-12, H-13, H-15	210,6 (C)			H-12, H-15, H-16
15	38,8 (CH ₂)	2,54 (<i>t</i> , <i>J</i> 7,3)	H-16		41,8 (CH ₂)	2,38 (<i>t</i> , <i>J</i> 7,3)		H-16
16	23,7 (CH ₂)	1,47 (<i>qui</i> , <i>J</i> 7,1)	H-15, H-18	H-15	23,2 (CH ₂)	1,44 (<i>qui</i> , <i>J</i> 7,1)	H-15	H-15
17	28,2 (CH ₂)	1,32 (<i>qui</i> , <i>J</i> 7,1)		H-15, H-11	28,5 (CH ₂)	1,27-1,20 (<i>m</i>)		H-15, H-16
18	31,0 (CH ₂)	1,23 (<i>m</i>)		H-19, H-20	31,1 (CH ₂)	1,22 (<i>m</i>)		H-19, H-20
19	21,9 (CH ₂)	1,24 (<i>m</i>)		H-20	22,0 (CH ₂)	1,25 (<i>m</i>)		H-20
20	13,9 (CH ₃)	0,85 (<i>t</i> , <i>J</i> 6,8)	H-19		13,9 (CH ₃)	0,85 (<i>t</i> , <i>J</i> 7,0)	H-19	
2'a	62,4 (CH ₂)	3,69 (<i>d</i> , <i>J</i> 10,5)	H-2'b		62,4 (CH ₂)	3,70 (<i>d</i> , <i>J</i> 10,5)	H-2'b	
2'b		3,57 (<i>d</i> , <i>J</i> 10,5)	H-2'a			3,58 (<i>d</i> , <i>J</i> 10,5)	H-2'a	

a: Dados obtidos no presente trabalho, em CD₃OD (400 MHz) para a substância **1** e CDC₃ (400 MHz) para a substância **2**.

b: br s = simpleto largo; d = dupleteo; dd = dupleteo duplo; q = quarteto; qui = quinteto; m = multipleteo; sl = simpleto; t = tripleteo.

c: *J* = constante de acoplamento escalar.

A substância **1** foi isolada como sólido branco que revelou-se como uma mancha marrom avermelhada de R.f. = 0,32 (FIGURA 22) após sua eluição em CCD com mistura de CHCl₃:MeOH:NH₄OH (10:4,5:0,5) e revelação com mistura de vanilina/H₂SO₄ e aquecimento.

Para a substância **1**, o espectro de massas (HRESIMS negativo) mostrou pico [M-H]⁻ com *m/z* de 398,2533 que correspondeu a fórmula molecular C₂₁H₃₇NO₆ (calc. 399,2621). O perfil de fragmentação obtido por ESI-MS/MS apresentou os seguintes sinais originados pelos íons: um pico base [M-H-294]⁻ em *m/z* 104,0351 e os fragmentos em *m/z* 332,2226, 127,1124 e 86,0246, respectivamente. O espectro de U.V. apresentou λ_{máximo} em 227 nm.

O espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CD₃OD) da substância **1** apresentou sinais correspondentes a 21 átomos de carbono. A partir da análise do subspectro DEPT-135 foi possível determinar a natureza dos carbonos, o que confirmou a presença de um carbono metílico, onze carbonos metilênicos, seis carbonos metínicos e de três carbonos quaternários.

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C da substância **1** apresentaram sinais característicos de cadeias alifáticas (δ 1,23-2,54/ δ 21,9-38,8) e sinais de grupo metílico terminal foram observados em δ 0,85 (1H, t, *J* = 6,75 Hz, H-20) e em δ 13,9 (C-20). Além disso, a substância **1** apresentou duas ligações duplas devido à presença de quatro sinais de carbonos olefínicos (δ 127,0 e 131,6; 131,6 e em δ 147,1 ppm) no espectro de ¹³C e de quatro sinais correspondentes à hidrogênios olefínicos (δ 5,39 e 5,40; 6,07 e em δ 6,83 ppm) no espectro de ¹H (TABELA 8). A conformação espacial (geometria) entre as duplas ligações localizadas nos carbonos C₆-C₇ e C₁₂-C₁₃ é *trans* devido ao grande sinal de acoplamento vicinal (*J*₆₋₇ = 15,4 Hz e *J*₁₂₋₁₃ = 15,9 Hz).

O espectro de RMN ¹³C mostrou também sinais em δ 169,9 e em δ 199,9 que correspondem a carbonos carbonílicos; a primeira carbonila correspondeu à um grupo cetona e a segunda foi atribuída à um grupo carboxílico. A localização do carbono da carbonila do grupo cetona foi confirmada pelos sinais de correlação dos hidrogênios H-13 (δ 6,07), e H-15 (δ 2,54) e com o sinal da carbonila (δ 199,9) no espectro do HMBC ('Heteronuclear Multiple Bond Correlation'). Outras correlações no mapa de contornos HMBC confirmam a posição do carbono da carbonila do ácido carboxílico (δ 169,9) no C-1 devido ao sinal de correlação com H-2' (δ 3,57 e δ 3,69). Os dupletos em δ 3,57 (1H, d, *J* = 10,5, H-2') e em δ 3,69 (1H, d, *J* = 10,5, H-2') foram atribuídos à hidrogênios geminais de um carbono primário oxigenado. Além disso, o espectro de RMN ¹H mostrou sinais de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados em δ 3,65 (1H, dd, *J* = 7,0; 7,0 Hz, H-4) e em δ 3,60 (1H, br. s, H-3). Os valores

das constantes de acoplamento destes sinais (δ 3,65 e δ 3,60) são semelhantes aos dos valores publicados para a miriocina sintética (SANO et al., 1995; JONES; MARSDEN, 2008), sugerindo a mesma configuração relativa destes dois centros quirais. Além disso, os valores das constantes de acoplamento dos hidrogênios são consistentes com a mesma estereoquímica dos carbonos das ligações duplas (Δ^6 -E e Δ^{12} -E). Apesar de terem sido observados picos cruzados entre H-4 (δ 3,65) e H-5 (δ 2,11) no espectro de ^1H - ^1H COSY o que confirma a posição vicinal entre estes prótons, não foi possível ver sinais de manchas de correlação no espectro de HMBC. Com base nestas evidências, a substância **1** foi identificada como sendo o ácido (6E, 12E)-2-amino-3,4-diidróxi-2-(hidróximetil)-14-oxo-icosa-6,12-dienóico. Na revisão de literatura, não foi encontrada ainda nenhuma referência científica que descreva o isolamento desta substância a partir de fungo do gênero *Mycosphaerella* e de outros fungos, como também não foi encontrado trabalho descrevendo a síntese por química orgânica.

A substância **2** foi isolada como um sólido branco que após CCD, eluída e revelada nas mesmas condições descritas acima, apresentou uma mancha de cor vinho avermelhada de R.f. = 0,34 (FIGURA 22). No espectro de U.V. demonstrou que seu máximo de absorção se encontra na região do ultravioleta de vácuo.

O espectro de massas (HRESIMS negativo) mostrou pico $[M-H]^-$ em m/z de 400,2707 que correspondeu à fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{39}\text{NO}_6$ (calc. 401,2777). O perfil de fragmentação obtido por ESI-MS/MS apresentou os seguintes picos originados pelos íons: um sinal de pico base $[M-H-296]^-$ em m/z 104,0356 e os fragmentos em m/z 334,2389 e 86,0249, respectivamente. Os espectros de RMN (^{13}C e ^1H) e HRESIMS da substância **2** mostraram que a principal diferença entre ela e a substância **1** é a ausência da dupla ligação entre os carbonos C_{12} - C_{13} . Portanto, a substância **2** foi identificada como sendo o ácido (6E)-2-amino-3,4-diidróxi-2-(hidróximetil)-14-oxo-icosa-6-enóico, uma substância conhecida como miriocina (KLUEPFEL et al., 1972).

A miriocina foi descrita pela primeira vez por Kluepfel et al. (1972) e na patente USA número 5,233,062 por Horn et al. (1993), com o nome de ácido 2-amino-3,4-diidróxi-2-(hidroximetil)-14-oxo-6-eicosanóico. A miriocina foi isolada dos fungos ascomicéticos *Myriococcum albomyces*, *Melanconis flavovirens*, *Isaria sinclairii* e *Paecilomyces variotii* ATCC 74097 (DICTIONARY of NATURAL PRODUCTS, 2013). Esta substância apresentou atividade óptica específica de $[\alpha]_{24\text{D}} +10.3$ (c, 0.386 em MeOH) e originou perfil de U.V. semelhante ao observado para a substância **2** isolada neste trabalho (KLUEPFEL et al., 1972; (DICTIONARY of NATURAL PRODUCTS, 2013).

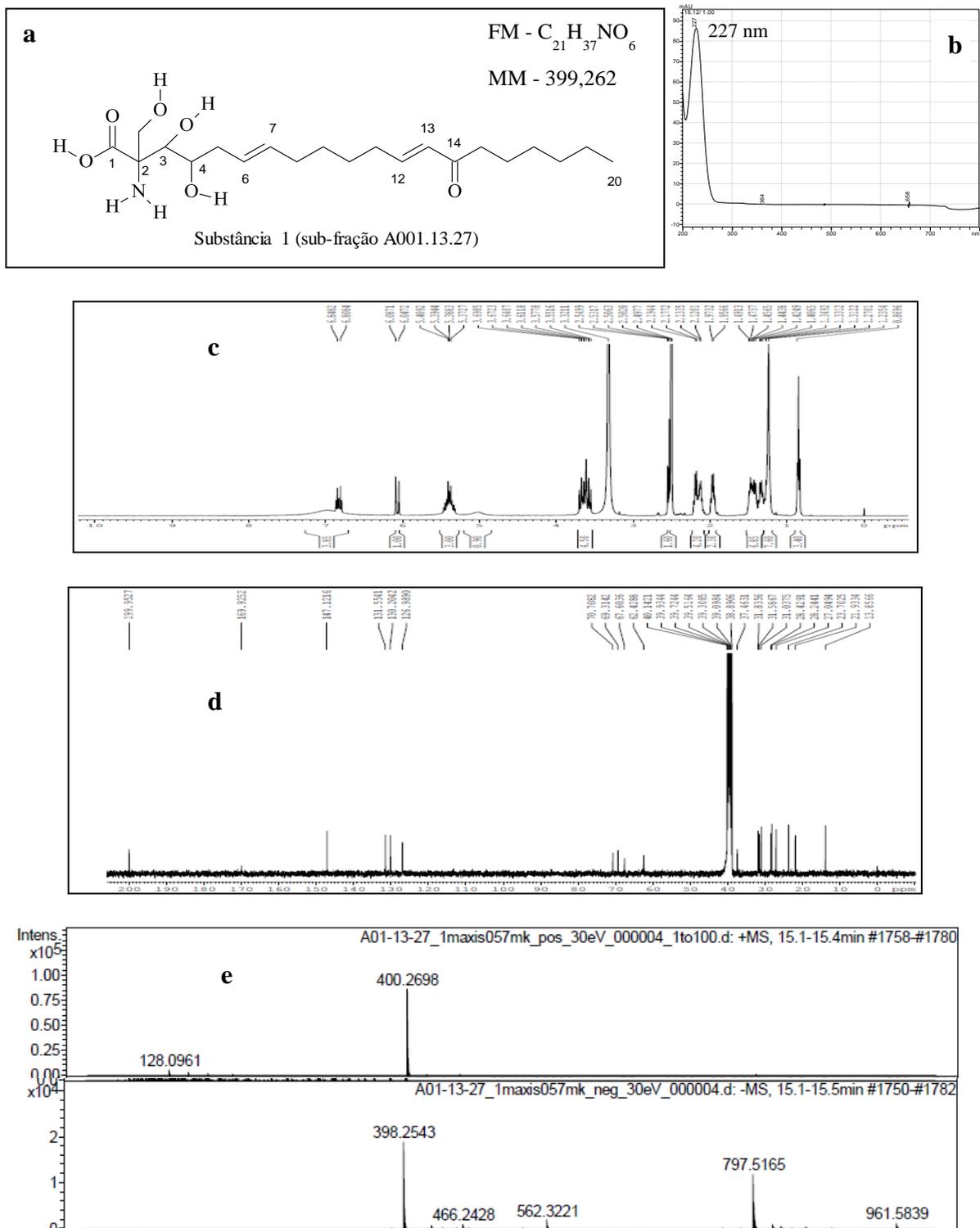


Fig. 25 – Representação dos experimentos realizados para identificação da substância **1** isolada do FE *Mycosphaerella* spp. UFMGCB 2032. **a**: estrutura química, fórmula molecular (FM) e massa molecular (MM); **b**: perfil de U.V. com $\lambda_{\text{máximo}}$ em 227 nm; **c**: espectro da RMN de 1H ; **d**: espectro de RMN de ^{13}C e **e**: espectro de massas.

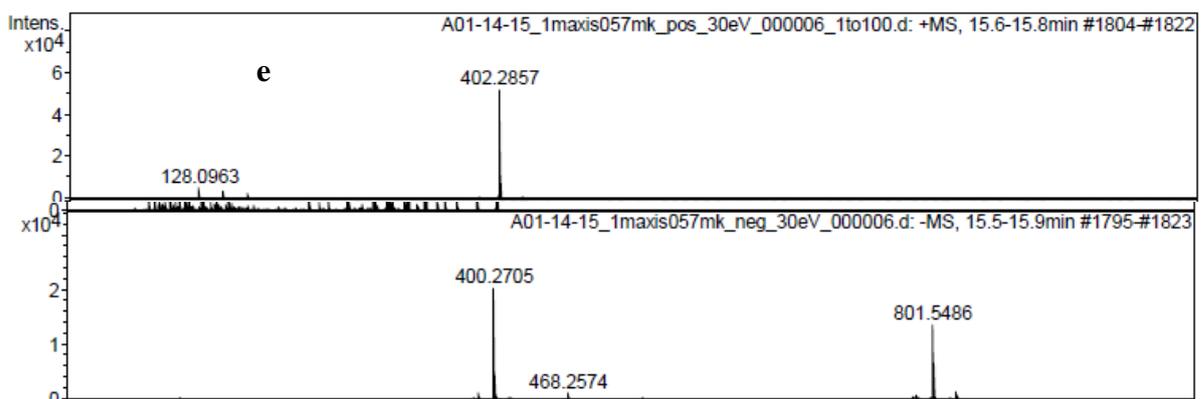
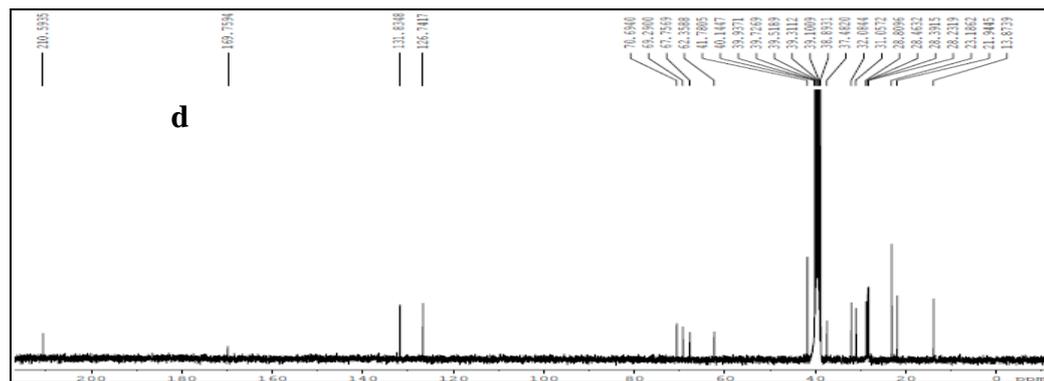
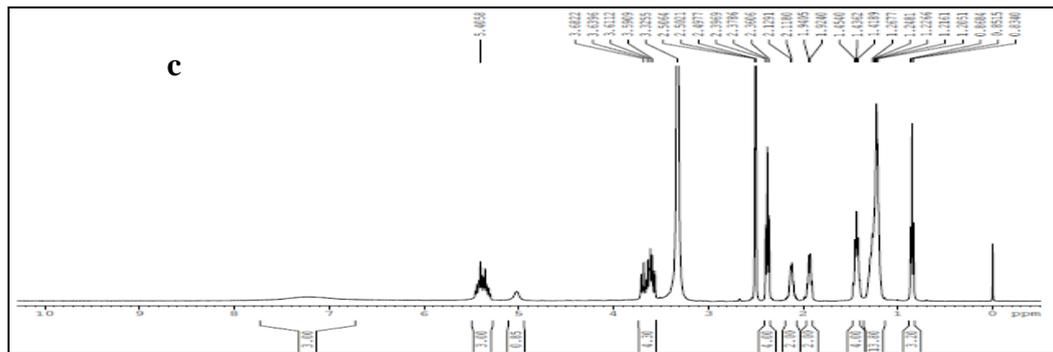
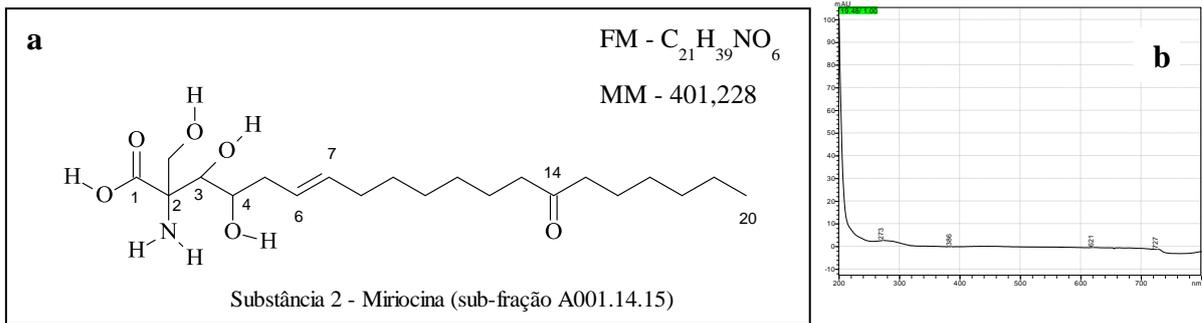


Fig. 26 – Representação dos experimentos realizados para identificação da substância **2** isolada do FE *Mycosphaerella* spp. UFMGCB 2032. **a**: estrutura química, fórmula molecular (FM) e massa molecular (MM); **b**: perfil de U.V.; **c**: espectro da RMN de ¹H; **d**: espectro de RMN de ¹³C e **e**: espectro de massas.

6.4.6 Determinação dos valores de CIMs frente à diferentes isolados de *Cryptococcus*

Os ensaios para a determinação dos valores de CIMs frente à diferentes isolados de *Cryptococcus* comprovaram a atividade antifúngica das duas substâncias isoladas do FE *Mycosphaerella* spp. UFMGCB 2032, da fração bruta AcOEt, frações e sub-frações contendo as substâncias isoladas frente à *C. neoformans* e *C. gattii*.

As substâncias **1** e **2** também foram ativas contra diferentes isolados de *Cryptococcus* (total de 15 isolados) conforme pode ser observado na Tabela 9. A substância **1** apresentou valores de CIMs contra *C. neoformans* e *C. gattii* com concentrações que variaram entre 0,19- 3,12 µg/mL. A substância **2** (miriocina) apresentou valores de CIMs entre 0,19- 0,78 µg/mL, e não foram encontrados nesta revisão de literatura ensaios antifúngicos com a miriocina contra as leveduras de *Cryptococcus*. Um trabalho descreve o isolamento das substâncias ativas a partir do extrato metanólico do FE *Massrisson* sp. contra *C. neoformans* ATCC32609, neste foram isolados os compostos massarigenina D, espiromassaritona e paecilospirona que apresentaram IC₈₀ de 16, 4 e 16 µg/mL, respectivamente (SUN et al. 2011).

Tabela 9. Valores da Concentração Inibitória Mínima – CIM do extrato bruto, fração acetato de etila (AcOEt), substâncias isoladas **1** e **2**, anfotericina B (AMB) e fluconazol (FC) contra diferentes isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*.

Isolado	CIM em µg/mL (entre parênteses em µM*)					
	AMB	FC	Extrato bruto	AcOEt	Substância 1	Substância 2
1 <i>C. neoformans</i> ATCC 24067	0,50 (0,54)	4,00 (13,06)	31,25	62,50	2,50 (6,26)	0,50 (1,24)
2 <i>C. neoformans</i> ATCC 62066	1,00 (1,08)	1,00 (3,26)	25,00	12,50	1,56 (3,91)	0,39 (0,97)
3 <i>C. neoformans</i> ATCC 28957	0,50 (0,54)	2,00 (6,53)	25,00	12,50	1,56 (3,91)	0,78 (1,95)
4 <i>C. neoformans</i> VM-MC	1,00 (1,08)	1,00 (3,26)	50,00	12,50	3,12 (7,82)	0,78 (1,95)
5 <i>C. neoformans</i> 96806	1,00 (1,08)	64,00 (208,96)	12,50	6,25	0,78 (1,95)	0,19 (0,48)
6 <i>C. neoformans</i> LMM 820	1,00 (1,08)	2,00 (6,53)	12,50	12,50	0,78 (1,95)	0,19 (0,48)
7 <i>C. neoformans</i> 5396	1,00 (1,08)	8,00 (26,12)	25,00	12,50	0,78 (1,95)	0,39 (0,97)
8 <i>C. gattii</i> ATCC 24065	0,25 (0,27)	4,00 (13,06)	7,80	7,80	2,50 (6,26)	0,50 (1,24)
9 <i>C. gattii</i> ATCC 24056	1,00 (1,08)	8,00 (26,12)	3,10	1,56	0,39 (0,98)	0,19 (0,48)
10 <i>C. gattii</i> ATCC 32608	1,00 (1,08)	16,00 (52,24)	12,50	6,25	0,78 (1,95)	0,39 (0,97)
11 <i>C. gattii</i> L27/01	1,00 (1,08)	8,00 (26,12)	25,00	12,50	1,56 (3,91)	0,78 (1,95)
12 <i>C. gattii</i> ICB 181	1,00 (1,08)	16,00 (52,24)	3,10	3,12	0,19 (0,49)	0,19 (0,48)
13 <i>C. gattii</i> LMM 818	1,00 (1,08)	16,00 (52,24)	50,00	25,00	3,12 (7,82)	0,78 (1,95)
14 <i>C. gattii</i> L 24/01	1,00 (1,08)	16,00 (52,24)	25,00	12,50	1,56 (3,91)	0,39 (0,97)
15 <i>C. gattii</i> 1913	1,00 (1,08)	8,00 (26,12)	50,00	25,00	3,12 (7,82)	0,78 (1,95)

* Concentrações em µM que foram comparadas nas análises estatísticas no programa GraphPad (versão 5,0). Observação: Para o extrato bruto e a fração acetato de etila (AcOEt) a análise estatística foi realizada utilizando os valores de CIM das substâncias **1** e **2** em µg/mL.

Os valores de CIMs obtidos para os antifúngicos (AMB e FC) e as duas substâncias isoladas (**1** e **2**) frente à *C. neoformans* e *C. gattii* foram comparados entre as diferentes espécies de *Cryptococcus* através do programa GraphPad (Teste de Wilcoxon) conforme descrito no Quadro 1. Os valores de CIMs dos antifúngicos e das substâncias isoladas não foram diferentes estatisticamente quando comparadas entre *C. neoformans* e *C. gattii*.

Quadro 1 – Grupos de CIMs comparados entre as duas espécies de *Cryptococcus* estatisticamente no programa GraphPad versão 5.0 (teste de Wilcoxon), valores de P obtidos e resultado da análise estatística.

	Antifúngico ou substância isolada	Grupos de CIMs comparados		Valor de P	Diferença significativa
1	AMB	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>	1,00	Não
2	FC	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>	0,39	Não
3	Substância 1	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>	0,75	Não
4	Substância 2	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>	1,00	Não

Diferença significativa para valor de P menor que 0,05

Os valores de CIMs obtidos para os antifúngicos e as duas substâncias isoladas frente à *C. neoformans* e *C. gattii* foram comparados através do programa GraphPad versão 5.0 (teste de Wilcoxon) conforme descrito no Quadro 2.

Quadro 2 – Grupos de CIMs para os dois isolados de *Cryptococcus* (n = 15) comparados estatisticamente no programa GraphPad versão 5.0 (teste de Wilcoxon), valores de P obtidos e resultado da análise estatística (diferença significativa).

Grupos de CIMs comparados		Valor de P	Diferença significativa
AMB	FC	< 0,01	Sim
AMB	Substância 1	< 0,01	Sim
AMB	Substância 2	0,18	Não
FC	Substância 1	< 0,01	Sim
FC	Substância 2	< 0,01	Sim
Extrato bruto	Substância 1	< 0,01	Sim
Extrato bruto	Substância 2	< 0,01	Sim
Fração AcOEt	Substância 1	< 0,01	Sim
Fração AcOEt	Substância 2	< 0,01	Sim
Substância 1	Substância 2	< 0,01	Sim

Diferença estatisticamente significativa para valor de p menor que 0,05

Os valores de CIMs entre os diferentes grupos comparados do Quadro 2 (n = 15) foram estatisticamente diferentes entre si, com exceção para os valores de CIM encontrados para a AMB e a substância 2 (P = 0,18). Este resultado mostra que as CIMs encontradas para a substância 2 são semelhantes às CIMs encontradas para a AMB. As diferenças significativas indicam que o processo de fracionamento levou ao isolamento de substâncias mais ativas que suas amostras de origem, pois houve redução dos valores de CIMs. Os valores de CIMs obtidos para as duas substâncias também foram comparados, e houve diferença estatisticamente significativa entre si (P = 0,0011). A única diferença entre as duas substâncias é a presença da dupla ligação entre os carbonos C₁₂-C₁₃ na substância 1, que parece conferir à esse metabólito atividade antifúngica menos potente em ensaios *in vitro*.

6.4.7 Ensaio de combinação de substâncias

Os ensaios foram realizados apenas com 4 leveduras (2 de *C. neoformans* e 2 de *C. gattii*) devido a pouca quantidade de substâncias disponível.

Os quatro tipos de efeitos (antagonismo, indiferente, aditivo e sinergismo) foram encontrados nos ensaios de microdiluição combinando os dois antifúngicos controles com as substâncias **1** e **2** frente aos isolados de *Cryptococcus* testados (TABELA 10).

Os resultados mostram que em 68,75 % dos ensaios (11 de 16), as leveduras foram indiferentes à combinação substância/antifúngico, em 25,0 % dos ensaios (4 de 16) observou-se sinergismo e em 6,25 % dos resultados houve antagonismo (1 de 16). As curvas de combinação dos quatro ensaios onde houve sinergismo entre o antifúngico e a substância isolada estão na Figura 27. Os perfis das curvas foram semelhantes ao perfil proposto para associações sinérgicas descrito por Pillai, Moellering Jr., Eliopoulos (2005). Os ensaios de combinação dos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e fluorocitosina frente a isolados de *Candida* realizados por Lewis et al. (2002) demonstraram uma taxa de 55,5 % de indiferença, resultado semelhante ao encontrado neste trabalho frente aos isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* estudados.

Santos et al. (2012) encontraram efeitos variando do sinergismo ao antagonismo após realizar ensaios de combinação de antifúngicos. Os efeitos variaram conforme a concentração das substâncias combinadas (AMB e FC) e o isolado de *C. gattii* estudado. Estes resultados são um importante sinal de alerta uma vez que essas substâncias são algumas vezes combinadas no tratamento (in vivo) da criptococose, o que pode causar falha terapêutica e agravamento do quadro clínico do paciente. A mesma variação de interação ocorreu no presente trabalho quando associamos a substância **1** com o fluconazol.

A investigação do comportamento de substâncias candidatas a antifúngicos frente aos antifúngicos empregados na terapêutica já foi realizada por Vivas et al. (2011). Os autores combinaram quatro hidrazonas esteroidais chamadas H1, H2, H3 e H4 com os antifúngicos posaconazol e um ajoeno sintético contra três isolados de *Cryptococcus* (42794, 4050 e 44192), empregando a metodologia do documento M27-A2 do CLSI. Foram observados sinergismos ao se combinar o posaconazol com ajoeno (antifúngico que altera os fosfolipídios da membrana fúngica), ajoeno com H3 e o posaconazol com H3, com valores de CIF de 0,24; 0,16 e 0,09 respectivamente, sendo tal comportamento importante para direcionamento de estudos clínicos. As substâncias que exigem menores quantidades para obter-se o efeito desejado em um tratamento são interessantes do ponto de vista fármaco-toxicológico e por isso são submetidas aos ensaios clínicos primeiro.

Porém, para determinar-se o tipo de interação predominante entre as substâncias isoladas no trabalho e os antifúngicos são necessários mais ensaios com mais isolados de *Cryptococcus*.

Tabela 10 - Resultado do ensaio de combinação das substâncias 1 e 2 com os antifúngicos anfotericina B (AMB) e fluconazol (FC) frente a dois isolados de *C. neoformans* (ATCC 24067 e ATCC 28957) e dois de *C. gattii* (ATCC 24065 e ATCC 32608).

Levedura	Substância/ antifúngico	CIM	Combinação	CIM combinado	CIF	ICFI	Resultado	
<i>C. neoformans</i> ATCC 24067	1	2,50	1 + AMB	0,12	0,04	1,04	Indiferente	
	2	0,50	AMB + 1	0,50	1,00			
	FC	4,00	1 + FC	0,12	0,04	0,07	Sinergismo	
			AMB	0,50	FC + 1	0,12	0,03	
				2 + AMB	0,23	0,46	1,46	Indiferente
				AMB + 2	0,50	1,00		
				2 + FC	0,23	0,46	0,52	Indiferente
				FC + 2	0,25	0,06		
<i>C. neoformans</i> ATCC 28957	1	0,78	1 + AMB	0,04	0,06	0,56	Indiferente	
	2	0,09	AMB + 1	1,00	0,50			
	FC	1,00	1 + FC	0,04	0,06	1,06	Indiferente	
			AMB	2,00	FC + 1	1,00	1,00	
				2 + AMB	0,02	0,24	0,49	Sinergismo
				AMB + 2	0,50	0,25		
				2 + FC	0,02	0,24	1,24	Indiferente
				FC + 2	1,00	1,00		
<i>C. gattii</i> ATCC 24065	1	0,39	1 + AMB	0,04	0,12	1,12	Indiferente	
	2	0,19	AMB + 1	1,00	1,00			
	FC	1,00	1 + FC	0,04	0,12	4,12	<i>Antagonismo</i>	
			AMB	1,00	FC + 1	4,00	4,00	
				2 + AMB	0,02	0,12	1,12	Indiferente
				AMB + 2	1,00	1,00		
				2 + FC	0,02	0,12	2,12	Indiferente
				FC + 2	2,00	2,00		
<i>C. gattii</i> ATCC 32608	1	0,39	1 + AMB	0,04	0,12	0,37	Sinergismo	
	2	0,09	AMB + 1	0,50	0,25			
	FC	8,00	1 + FC	0,04	0,12	1,12	Indiferente	
			AMB	2,00	FC + 1	8,00	1,00	
				2 + AMB	0,01	0,13	0,38	Sinergismo
				AMB + 2	0,50	0,25		
				2 + FC	0,01	0,13	2,13	Indiferente
				FC + 2	16,00	2,00		

CIF – Concentração Inibitória Fracional da substância ou do antifúngico, ICFI – Índice da concentração inibitória fracional (soma do CIF substância com CIF antifúngico).

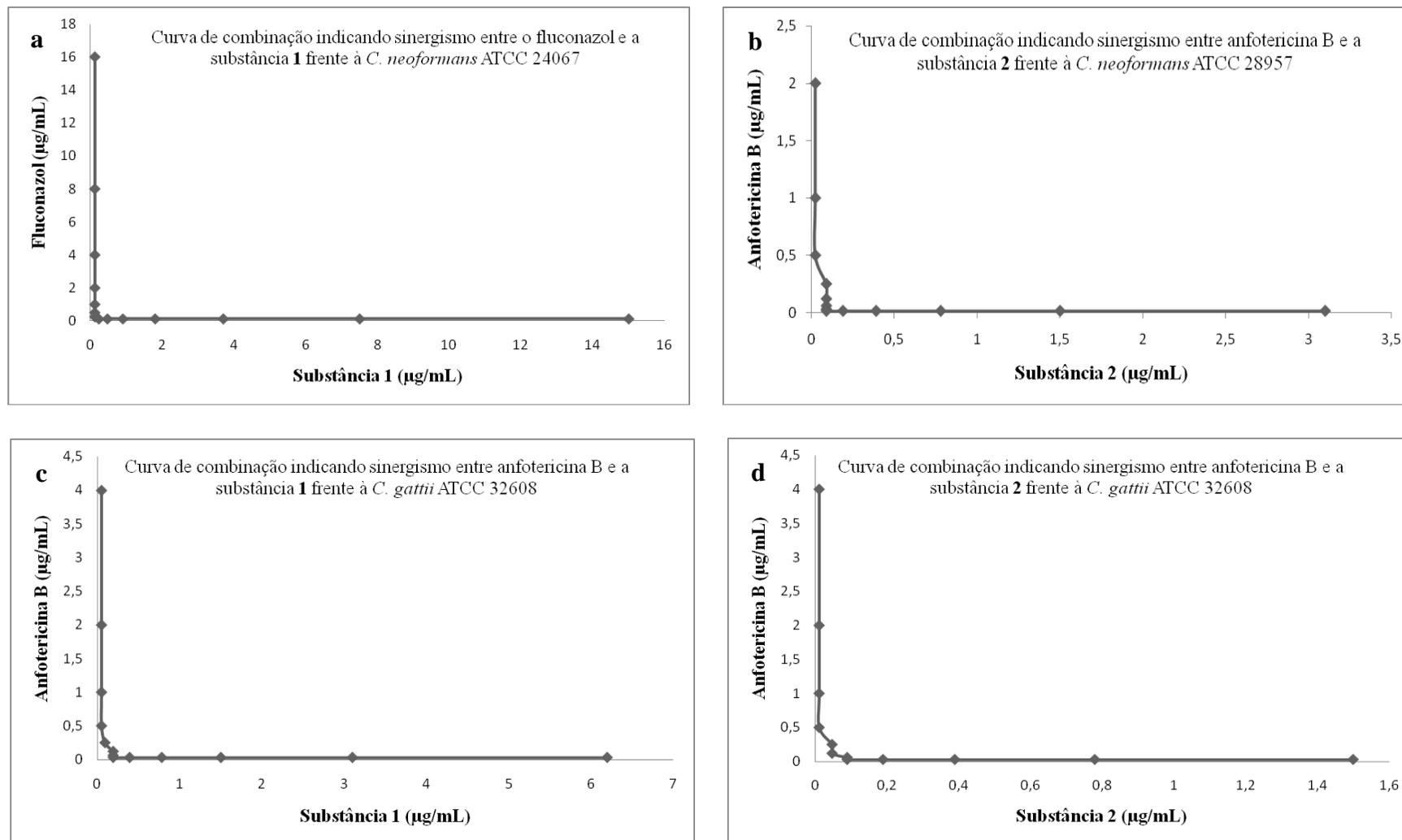


Fig. 27 – Curvas de combinação das quatro associações sinérgicas encontradas entre o antifúngico e a substância isolada frente às espécies de *Cryptococcus*. **a** – Fluconazol com a substância 1 frente a *C. neoformans* ATCC 24067, **b** – anfotericina B (AMB) com a substância 2 frente a *C. neoformans* ATCC 28957, **c** – AMB com a substância 1 e **d** – AMB com a substância 2 frente a *C. gattii* ATCC 32608.

6.4.8 Ensaio com diferentes alvos biológicos

Outros ensaios foram realizados com as substâncias **1** e **2**. Os alvos foram *Candida albicans*, *C. krusei*, *Leishmania (L.) amazonensis* e duas linhagens de células tumorais humana (MCF-7 e TK-10). Os resultados destes ensaios encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11. Resultados dos ensaios com as substâncias **1** e **2** em diferentes alvos biológicos: CIM contra *Candida albicans* e *C. krusei*; e porcentagens de inibição sobre as duas linhagens de células tumorais humana (MCF-7 e TK-10) e sobre *Leishmania (L.) amazonensis* a 20 µg/mL.

Substância	CIM (µg/mL)		Porcentagem de inibição		
	<i>C. albicans</i> ATCC	<i>C. krusei</i> ATCC	MCF-7	TK-10	<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>
1	2,50	25,0	29	45	11
2	2,50	10,0	19	48	14

As duas substâncias isoladas apresentaram atividade antifúngica contra os isolados de *Candida* avaliados, com valores de CIM similares aos valores encontrados nos ensaios com as duas espécies de *Cryptococcus*. A substância **2** (miriocina) já foi submetida ao ensaio para determinação da CIM frente a 10 isolados de *C. albicans* e encontraram faixa de CIM entre 1,6-25,0 µg/mL (KLUEPFEL et al., 1972), e estes valores foram similares aos resultados encontrados no presente trabalho (CIM 2,5-25,0 µg/mL).

Nos estudos iniciais, Kluepfel et al. (1972) consideraram a miriocina inapropriada para emprego terapêutico devido a toxicidade da substância após administração oral e intramuscular em modelo murino (DL 300 mg/kg). No geral, a miriocina é utilizada em estudos científicos como imunossupressora, inibe a enzima serina-palmitoil transferase e possui atividade antifúngica contra *Alternaria solani*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, *C. tropicalis*, *Ceratocytis ulmi*, *Cryptococcus laurentii*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizomucor miehei* e *Streptomyces* spp. (KLUEPFEL et al., 1972; HORN et al., 1993; FUJITA et al., 1994b; BRUNNER; KOSKINEM, 2004; DICTIONARY of NATURAL PRODUCTS, 2013). Fugita et al. (1994a) isolaram a miriocina do fungo *Isaria sinclairii* e realizaram modificações estruturais obtendo o derivado cloridrato de 2-amino-2-[2-(4-

octilfenil) etil] propano-1,3-diol. Este foi chamado de FTY720 ou fingolimod que apresentou potente atividade imunossupressora e baixa toxicidade (FUGITA et al., 1994b). O fingolimod foi avaliado *in vitro* contra três linhagens de células de câncer de mama (MFC-7, MDA-MC-231 e Sk-Br-3), duas linhagens de células de câncer colorretal (HCT-116 e SW620) e uma linhagem de câncer de próstata (LNCaP-AI). Os resultados mostraram inibição do crescimento das linhagens com valor de IC₅₀ entre 5-20 µM (STRADER, 2012). Embora a substância **2** isolada no trabalho seja a substância de origem do derivado, esta não apresentou atividade citotóxica semelhante à do 'fingolimod' frente às células tumorais humanas avaliadas (MCF-7 e TK-10). O Fingolimod foi liberado para tratamento da esclerose múltipla pelo FDA em 2010 (BRINKMANN et al., 2010). A semelhança estrutural da substância **1** com a substância **2**, pode sugerir que a substância **1** também apresente a atividade imunossupressora já bem conhecida da substância **2** ou miriocina (MIYAKE et al., 1995), contudo é preciso investigar sobre sua citotoxicidade. A descoberta de uma nova substância com atividade antifúngica e capaz de suprimir o sistema imunológico seria importante, pois esta poderia ser utilizada com as duas finalidades. Tal substância agiria na imunossupressão dos pacientes submetidos a transplante de órgãos sólidos e na prevenção do desenvolvimento não só da criptococose como também de outras infecções fúngicas oportunistas que podem ocorrer nos pacientes após transplante.

A baixa porcentagem de inibição encontrada para a substância **2** (miriocina) no ensaio frente a forma amastigota-like de *Leishmania (L.) amazonensis* foi contrária ao resultado de Castro et al. (2013) que avaliaram a miriocina frente a forma promastigota de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (WMHOM/BR/1987/M11272). Neste trabalho os autores encontraram redução do crescimento de 52 % e alterações morfológicas (formas arredondadas e flagelos curtos) quando submeteram os parasitos a 1,0 µM de miriocina.

6.4.9 Ensaio de microscopia eletrônica de varredura das leveduras de *Cryptococcus* tratadas com as substâncias isoladas **1** e **2**

Após a confirmação do efeito antifúngico, as leveduras de *Cryptococcus* foram tratadas com as substâncias isoladas em concentrações subinibitórias a fim de se observar possíveis modificações na morfologia da célula fúngica e estas foram investigadas através da microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Os isolados *C. neoformans* (ATCC 24067) e *C. gattii* (ATCC 24065) foram cultivados frente às substâncias **1** e **2** nas concentrações subinibitórias de 2,0 µg/mL e 0,3 µg/mL, respectivamente. As microfotografias obtidas após MEV das leveduras estão na Figura 28.

As análises das MEV permitiram notar modificações na morfologia fúngica em ambas espécies de *Cryptococcus* como: deformações no formato celular, depressões na superfície e enrugamento acentuado, quando comparadas às leveduras do controle. As leveduras de *C. gattii* também sofreram redução no tamanho após expostas às duas substâncias isoladas quando comparadas com a levedura sem tratamento. Além disto, após o tratamento das leveduras não observou-se a presença de brotos nas células mãe, o que pode indicar inibição no brotamento.

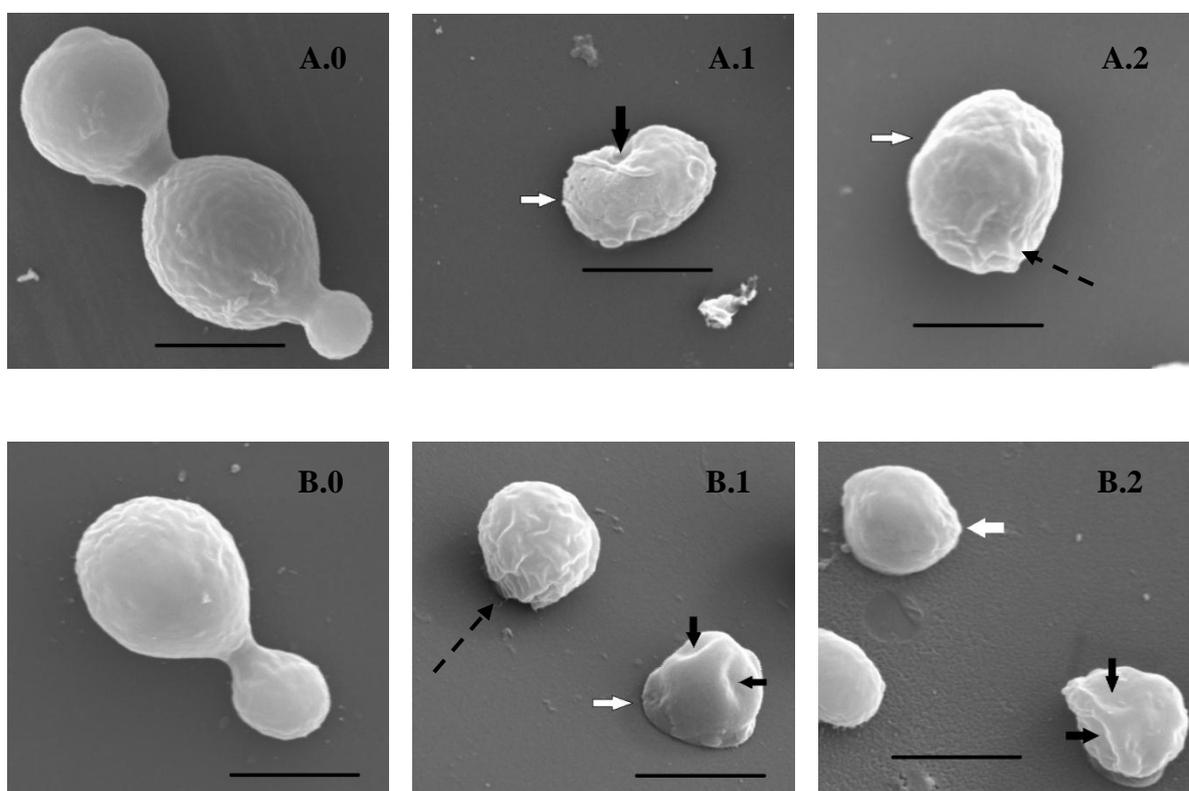
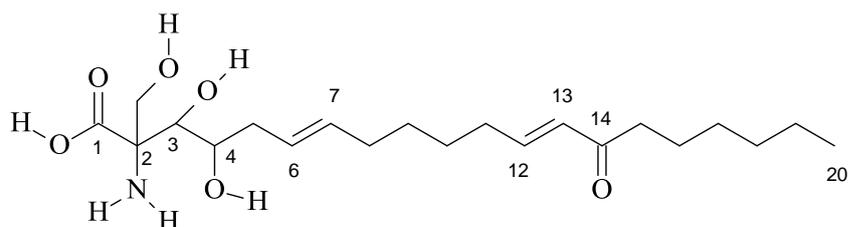
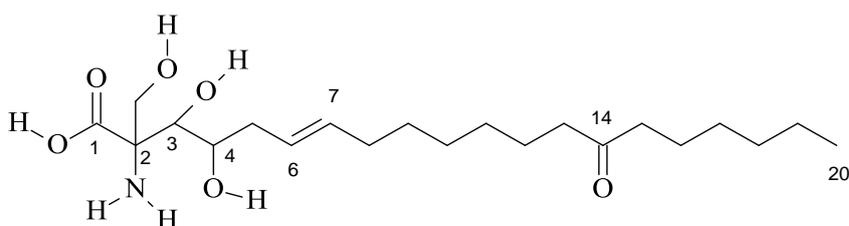


Fig. 28 – Microscopia eletrônica de varredura de *C. neoformans* ATCC 24067 (A) e *C. gattii* ATCC 24065 (B). As leveduras foram cultivadas por 3 dias a 30°C em RPMI supl. (controles sem antifúngico A.0 e B.0), e na presença das substâncias: **1** (A.1 e B.1) e **2** (A.2 e B.2) nas concentrações subinibitória de 2,0 µg/mL e 0,3 µg/mL, respectivamente. Podem ser observadas deformações no formato das leveduras (seta branca), depressões na superfície (setas pretas) e enrugamento acentuado (seta pontilhada). Aumento de 10.000 X e as barras representam 3,0 µm.

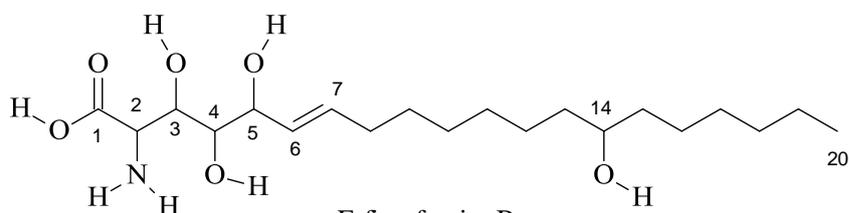
Tais modificações podem ser indício da possível interação das substâncias **1** e **2** com a membrana celular fúngica, uma vez que estas são estruturalmente semelhantes à miriocina que por sua vez, é semelhante às esfingosinas que são importantes componentes das membranas celulares fúngicas, porém não podemos afirmar se as substâncias interagem diretamente com os componentes da membrana devido a semelhança estrutural ou se interferem na rota biosintética das esfingosinas (FIGURA 29).



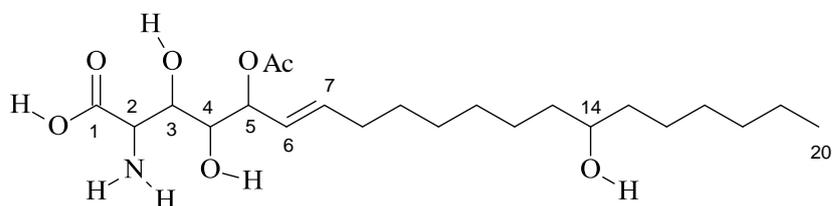
Substância 1 (sub-fração A001.13.27)



Substância 2 - Miriocina (sub-fração A001.14.15)



Esfingofungina B



Esfingofungina C

Fig. 29 – Estruturas químicas das substâncias **1**, substância **2** (Miriocina) e esfingofunginas B e C (BRUNNER; KOSKINE, 2004).

As esfingofunginas foram encontradas durante programa de pesquisa de substâncias antifúngicas do laboratório Merck, Sharp & Dohme em 1992. As esfingofunginas B e C

foram isoladas do fungo termo tolerante *A. fumigatus* (BRUNNER; KOSKINE, 2004). A semelhança estrutural pode explicar a desestabilização da membrana fúngica que culminou na morte das leveduras de *Cryptococcus*. Porém, a interação com os componentes lipídicos da membrana fúngica precisa ser confirmada em estudos adicionais. A parede e a membrana celular fúngicas são alvo da maioria dos compostos antifúngicos, como exemplos temos a equinocandinas que inibem a enzima β -1,3-glucana sintase que está envolvida na síntese da parede celular, e os polienos (AMB) que formam poros e promovem deformações na membrana modificando a integridade celular (SHARON et al. 2009).

Supaphon et al. (2013) isolaram FEs de grama marinha, produziram os extratos brutos com diferentes solventes orgânicos e trataram os isolados de *C. neoformans* (ATCC 90112 e ATCC 90113) com os extratos brutos dos FEs mais ativos encontrados nos ensaios de determinação da CIM (PSU-ES43CH, PSU-ES190CH e PSU-ES73CE). As duas leveduras foram visualizadas por microscopia eletrônica de varredura, e apresentaram modificações morfológicas como deformações, enrugamento, rompimento das células, sendo tais alterações semelhantes às encontradas no trabalho quando tratamos as leveduras de *C. neoformans* e *C. gattii* com as substâncias isoladas.

7 CONCLUSÕES

- ✓ Foi possível encontrar extratos com atividade antifúngica contra as duas espécies patogênicas de *Cryptococcus* dentre os fungos endofíticos da Coleção de Microorganismos e Células do ICB/UFMG estudados, demonstrando assim, o potencial dos fungos endofíticos do cerrado brasileiro;
- ✓ O extrato do FE *Mycosphaerella* spp. UFMGCB 2032, isolado da planta *E. aff. bimarginata* apresentou atividade constante após sucessivos re-cultivos em meio BDA;
- ✓ Duas substâncias foram isoladas e identificadas, substância **1**, com faixa de CIMs entre 0,19-3,12 µg/µL; e a substância **2**, com faixa de CIMs entre 0,19-0,78 µg/µL frente às duas espécies *Cryptococcus*;
- ✓ As substâncias **1** e **2** exibiram atividade antifúngica contra todos os isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* avaliados;
- ✓ A diferença significativa entre as concentrações inibitórias mínimas das substâncias **1** e **2** deve-se apenas pela presença da dupla ligação entre os carbonos C₁₂-C₁₃ na substância **1**;
- ✓ Não foram encontrados trabalhos descrevendo o isolamento e elucidação estrutural para a substância **1**, portanto a substância é inédita;
- ✓ Nos ensaios de combinação das substâncias **1** e **2** com os antifúngicos (anfotericina B e fluconazol) foi encontrado sinergismo em 25 % dos ensaios;
- ✓ As substâncias **1** e **2** não são consideradas ativas contra o parasito de *Leishmania* (L.) *amazonensis* (isolado IFLA/BR/196/PH-8) avaliado e nem contra as células tumorais humanas MCF-7 (mama) e TK-10 (rins);
- ✓ As substâncias apresentaram atividade antifúngica também contra *Candida albicans* ATCC 18804 e *C. krusei* ATCC 6258;
- ✓ A Microscopia Eletrônica de Varredura permitiu observar modificações e deformações nas duas espécies de *Cryptococcus* tratadas com as substâncias isoladas.

8 PERSPECTIVAS

As substâncias antifúngicas isoladas estão sendo submetidas a testes adicionais (microscopia eletrônica de transmissão e permeabilidade da membrana – extravasamento de íons K^+) para determinação do mecanismo de ação sobre as leveduras de *Cryptococcus* e sobre outras espécies. Poderão ser realizados ensaios com os esfingolipídios para comprovar o mecanismo de ação das substâncias. Além disso, as substâncias **1** e **2** por terem apresentado atividade antifúngica com baixos valores de CIM, poderão ser submetidas a ensaios para avaliação da citotoxicidade em células não tumorais de mamíferos.

A fração hexânica do extrato do FE UFMGCB 2032 apresentou atividade antifúngica contra *Paracoccidioides brasiliensis*. Essa fração será submetida ao fracionamento biomonitorado para isolamento e caracterização das substâncias ativas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-SALAM, H. A. *In vitro* susceptibility of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from Egypt to seven antifungal drugs. **Mycoses**, v. 48, p. 327-332, 2005.

ABDOU, R. et al. Botryorhodines A-D, antifungal and cytotoxic depsidones from *Botryosphaeria rhodina*, an endophyte of the medicinal plant *Bidens pilosa*. **Phytochemistry**, v. 71, p. 110-116, 2010.

ABEGG, M. A. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of *Psittaciformes* in a southern Brazilian zoological garden. **Mycopathologia**, v. 161, p. 83-91, 2006.

AGUADO, J. M. et al. Recomendaciones sobre el tratamiento de la candidiasis invasiva y otras infecciones por levaduras de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Actualización 2011. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 29, n. 5, p. 345-361, Abr. 2011.

ALBINATI, A. et al. Rosigenin, an unusual metabolite from *Mycosphaerella rosigena*. **Tetrahedron**, v. 36, p. 117-121, 1980.

ANTACHOPOULOS, C.; WALSH, T. J. Immunotherapy of *Cryptococcus* infectious. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 2, p. 126-133, 2012.

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. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 3, p. 194-197, 2009.

ARNOLD, A. E. et al. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? **Ecology Letters**, v.3, p. 267-274, 2000.

ARNOLD, A. E. et al. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 26, p. 15649-15654, 2003.

ARNOLD, A. E.; LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? **Ecology**, v. 88, n. 3, p. 541-549, 2007.

ARNONE, A. et al. Secondary mould metabolites. Part 15. Structure elucidation of rubellins A and B, two novel anthraquinone metabolites from *Mycosphaerella rubella*. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions**, v. 1, p. 255-260, 1986.

ARNONE, A., et al. Asteromine, a bioactive secondary metabolite from a strain of *Mycosphaerella asteroma*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 3, p. 595-597, 1995.

ARNONE, A., NASINI, G. and PAVA, O. V. A reinvestigation of the structure of biruloquinone, a 9,10-phenanthrenequinone isolated from *Mycosphaerella rubella*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 8, p. 2729-2731, 1991.

ARNONE, A., NASINI, G. and PAVA O. V. A hydroxytetradecatrienoic acid from *Mycosphaerella rubella*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 3, p. 507-510, 1998.

ASSANTE, G., et al. Mycochromone and Mycoxanthone: two new metabolites from *Mycosphaerella rosigena*. **Phytochemistry**, v. 18, p. 311-313, 1979.

ASSANTE, G., et al. Secondary metabolites from *Mycosphaerella ligulicola*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 8, p. 1955-1957, 1981.

AZEVEDO, J. L. et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, Apr. 2000.

BACON, C. W.; WHITE, J. F., Jr. **Microbial Endophytes**. New York: Marcel Dekker. 2000.

BADDLEY, J. W. et al. Transmission of *Cryptococcus neoformans* by organ transplantation. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 4, p. e94-e98, 2011.

BARBOSA, A. T. F. et al. Isolated pulmonary cryptococosis in an immunocompetent patient. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 5, p. 476-480, 2006.

BARKER, R. D. The primary pulmonary lymph node complex of cryptococcosis. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 65, n. 1, p. 83-92, 1976.

BARONI, F. A. et al. *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro city, RJ, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 2, p. 71-75, Mar./Apr. 2006.

BELLO, Y. B. et al. Cryptococcal meningitis in immunocompetent patient-case report. **American Medical Journal**, v. 4, n. 1, p. 100-104, 2013.

BENNETT, J. E.; KWON-CHUG, K. J.; THEODORE, T. S. Biochemical differences between serotypes of *Cryptococcus neoformans*. **Sabouraudia**, v. 16, n. 3, p. 167-174, 1978.

BERG, J.; CLANCY, C. J.; NGUYEN, M. H. The hidden danger of primary fluconazole prophylaxis for patients with AIDS. **Clinical Infectious Disease**, v. 26, p. 186-187, 1998.

BIRLEY, H. D. L. et al. Azole drug resistance as a cause of clinical relapses in AIDS patient with cryptococcal meningitis. **International Journal of STD & AIDS**, v. 6, p. 353-355, 1995.

BIVANCO, F. C.; MACHADO, C. d'A. S.; MARTINS, E. L. Criptococose cutânea. **Arquivo Medicina ABC**, v. 31, n. 2, p. 102-109, 2006.

BORGES, K. B. et al. Endophytic fungi as models for the stereoselective biotransformation of tyhioridazine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, n. 3, p. 669-674, 2007.

BOSSCHE, H. V. et al. Mechanisms and clinical impact of antifungal drug resistance. **Medical Mycology**, v. 32, suppl. 1, p. 189-202, 1994.

BOSSCHE, H. V. Mechanisms of antifungal resistance. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 14, p. 44-49, 1997.

BOTTS, M. R.; HULL, C. M. Dueling in the lung: how *Cryptococcus* spores race the host for survival. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, p. 437-442, 2010.

BOVERS, M. et al. AIDS patient death caused by novel *Cryptococcus neoformans* x *C. gattii* hybrid. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 7, p. 1105-1108, July 2008.

BOVERS, M.; HAGEN, F.; BOEKHOUT, T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 25, p. S4-S12, 2008.

BRAKHAGE, A. A.; SCHROECKH, V. Fungal secondary metabolites – strategies to activate silent gene clusters. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, p. 15-22, 2011.

BRANDT, M. E.; PFALLER, M. A.; HAJJEK, R. H. et al. Trends in antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates in the United States: 1992 to 1994 and 1996 to 1998. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 3065-3069, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 8. ed. Série B. Textos Básicos de Saúde. Brasília, 2010, p. 124-126. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/doen_infecciosas_guia_bolso_8ed.pdf>.

Acesso em: 12 de agosto de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. **Boletim Epidemiológico AIDS DST versão preliminar**, Ano IX, nº01, até semana epidemiológica 26^a - Jun. 2012. Brasília, 2012. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2012/52654/boletim_jornalistas_pdf_22172.pdf> Acesso em: 12 de agosto de 2013.

BRINKMANN, V. et al. Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 11, p. 883-897, 2010.

BROMILOW, J.; CORCORAN, T. *Cryptococcus gattii* infection causing fulminant intracranial hypertension. **British Journal of Anaesthesia**, v. 99, n. 4, p. 528-531, July 2007.

BRUNNER, M.; KOSKINEM, A. M. P. Biology and Chemistry of Sphingosine-related metabolites. **Current Organic Chemistry**, v. 8, n. 17, p. 1629-1645, 2004.

BRYAN, R. A. et al. Radioimmunotherapy is more effective than antifungal treatment in experimental cryptococcal infection. **Journal of Infectious Disease**, v. 202, p. 633-637, 2010.

BUDHIRAJA, A. et al. Bioactive metabolites from an endophytic fungus of *Aspergillus* species isolated from seeds of *Gloriosa superba* Linn. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, n. 1, p. 323-329, 2013.

BUNGIHAN, M. E. et al. Bioactive metabolites of *Diaporthe* sp. P133, an endophytic fungus isolated from *Pandanus amaryllifolius*. **Journal of Natural Medicines**, v. 65, p. 606-609, 2011.

BYRNES, E. J.; MARR, K. A. The outbreak of *Cryptococcus gattii* in western north America: epidemiology and clinical issues. **Current Infectious Disease Reports**, v. 13, p. 256-261, 2011.

CAFÊU, M. C. et al. Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae), **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 991-995, 2005.

CALLAHAN, H. L. et al. An axenic amastigote system for drug screening. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 4, p. 818-822, 1997.

CAMPOS, F. F. et al. Leishmanicidal metabolites from *Cochliobolus* sp., an endophytic fungi isolated from *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae). **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 12, e348, 11p. Dec. 2008.

CANNON, R. D. et al. Efflux-mediated antifungal drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 2, p. 291-321, Apr. 2009.

CANNON, P. F.; SIMMONS, C. M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama forest Reserve, Guyana. **Mycology**, v. 94, n. 2, p. 210-220, 2002.

CARVALHO, W. de F. **Técnicas Médicas de Hematologia e Imuno-hematologia**. 6 Ed. Belo Horizonte: COOPMED, 1994.

CARVALHO, C. R. et al. The diversity, antimicrobial and anticancer activity of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (*Fabaceae*) from the Brazilian savannah. **Symbiosis**, v. 57, n. 2, p. 95-107, 2012.

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

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in distilled water. **The Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p.181-184, 1967.

CASTRO, E. V. et al. Myriocin, a serine palmitoyltransferase inhibitor, blocks cytokinesis in *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 60, p. 377-387, 2013.

CATTANA, M. E. et al. Native trees of the Northeast Argentine: natural hosts of the *Cryptococcus neoformans* – *Cryptococcus gattii* species complex. **Revista Iberoamericana de Micología**, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2013.06.005>

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Cryptococcal meningitis: a deadly fungal disease among people living with HIV/AIDS**, 4 p., 2013. Disponível em: <www.cdc.gov/fungal/pdf/at-a-glance-508c.pdf>. Consultado em 13 de agosto de 2013.

CHANWAY, C. P. Endophytes: they're not just fungi! **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 74, n. 3, p. 321-322, 1996.

CHATURVEDI, V.; CHATURVEDI, S. *Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal pathogen. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 11, p. 564-571, 2011.

CHEN, J. et al. *Cryptococcus neoformans* strains and infections in apparently immunocompetent patients, China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 5, p. 755-762, May 2008.

CHEN, S. C. et al. Clinical manifestations of *Cryptococcus gattii* infection: determinants of neurological sequelae and death. **Clinical Infectious Disease**, v. 55, p. 789-798, 2012.

CHENG, M. J. et al. Secondary metabolites from the endophytic fungus *Biscogniauxia formosana* and their antimycobacterial activity. **Phytochemistry Letters**, v. 5, p. 467-472, 2012.

CHERNIAK, R.; SUNDSTROM, J. B. Polysaccharide antigens of the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 5, p. 1507-1512, 1994.

CLAUSELL, D. T. Infecção primitiva do sistema nervoso central por *Torulopsis neoformans* (= *Torula histolytica*). **Anais da Faculdade de Porto Alegre**, v. 9, p. 71-77, 1949.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard-Third Edition. Document M 27-A3, v. 28, n.14**. Wayne: CLSI, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: approved guideline M44-A**. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2004.

COGLIATI, M. et al. Origin of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* diploid strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 3889-3894, 2001.

COGLIATI, M. Global molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*: an Atlas of the molecular types. **Scientifica**, 23 pages, 2013, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/675213>.

CORLETT, M. An annotated list of the published names in *Mycosphaerella* and *Sphaerella*. **Mycologia Memoir**, v. 18, p. 1-328, 1991.

CORREA, M.P.S.C. et al. The spectrum of computerized tomography (CT) findings in central nervous system (CNS) infection due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in immunocompetent children. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n.5, p. 283-287, 2002.

CORTIJO, G. P. et al. Infecciones por hongos levaduriformes: *Candida* sp. Y *Cryptococcus* sp. **Medicine**, v. 9, n. 57, p. 3693-3701, 2006.

COSTA, E.S. et al. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the Cerrado, Brazil. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 705-707, 2008.

COTA, B. B. et al. A potent trypanocidal component from the fungus *Lentinus strigosus* inhibits trypanothione reductase and modulates PBMC proliferation. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 3, p. 263-270, May, 2008.

CUENCA-ESTRELLA, M. Combination of antifungal agents in the therapy – what value are they? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, p. 854-869, 2004.

CROUS, P. W. et al. Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on *Eucalyptus*. II. **Studies in Mycology**, v. 55, p. 99-131, 2006.

DAVEY, K. G. et al. *In vitro* susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates to fluconazole and itraconazole. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, p. 217-220, 1998.

DEMAIN, A. L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 9 pages, 2013, <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-013-1325-z>.

DIAS, A. L. T. **Diversidade fenotípica e genotípica de isolados ambientais e clínicos de *Cryptococcus neoformans*: sorotipos, “mating-types”, cariótipos, sensibilidade aos antifúngicos e isoenzimas superóxido dismutases**. 182f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo - São Paulo, 2006.

DICTIONARY of NATURAL PRODUCTS on DVD-ROM, Chapman & Hall, London, 2013.

DINATO, S. L. M. et al. Disseminated cutaneous cryptococcosis in a patient with AIDS. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 6, p. 353-358, Nov./Dec. 2006.

DUGGAL, S. et al. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* causing meningitis in a young immunocompetent male: an unusual case. **Journal Indian Academy of Clinical Medicine**, v. 9, n. 3, p. 224-226, July/ Sept. 2008.

ECEVIT, I. Z. et al. The poor prognosis of central nervous system cryptococcosis among non-immunosuppressed patients: a call for better disease recognition and evaluation of adjuncts to antifungal therapy. **Clinical Infectious Disease**, v. 42, p. 1443-1447, Apr. 2006.

EDGAR R. C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. **BMC Bioinformatics**, v. 5, 113p., 2004a.

EDGAR R. C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 1792-1797, 2004b.

ESPINEL-INGROFF, A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 25, p. 101-106, 2008.

EUCAST-SUBCOMMITTEE OF ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY TESTING OF THE EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY TESTING (EUCAST). **Method for determination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. Document 7.1.** Taufkirchen, Germany: ECSMID, 2002.

FAVALESSA, O. C. et al. Primeira descrição da caracterização fenotípica e susceptibilidade *in vitro* a drogas de leveduras do gênero *Cryptococcus* spp. isoladas de pacientes HIV positivos e negativos, Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 6, p. 661-665, 2009.

FELLER, I. C. Effects of nutrient enrichment on growth and herbivory of dwarf red mangrove (*Rhizophora mangle*). **Ecological Monographs**, v. 65, p. 477-505, 1995.

FERNANDES, O. de F. L. et al. *Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes com AIDS. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, n. 1, p. 75-78, jan./fev. 2000.

FERNANDES, M. R. V. **Atividade biológica do extrato da fermentação do fungo endófito de café *Alternaria alternata*.** 2008. 47f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Alfenas – Minas Gerais. Alfenas, 2008.

FERREIRA, M. C. **Diversidade e bioprospecção de fungos endofíticos associados à *Carapa guianensis* Aublet (ANDIROBA).** 117f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais – Minas Gerais. Belo Horizonte, 2013.

FIRÁKOVÁ, S.; ŠTURDÍKOVÁ, M.; MÚČKOVÁ, M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. **Biologia Bratislava**, Section Botany, v. 62, n. 3, p. 251-257, 2007.

FRANZOT, S. P.; SALKIN, I. F.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 832-840, 1999.

FRASER, J. A. et al. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. **Nature**, v. 437, p. 1360-1364, 2005.

FUGITA, T. et al. Fungal Metabolites. Part 11. A potent immunosuppressive activity found in *Isaria sinclairii* metabolite. **Journal of Antibiotics**, v. 47, p. 208-215, 1994a.

FUGITA et al. Fungal Metabolites. Part 12. Potent immunosuppressant, 14-deoxomyriocin, (2S, 3R, 4R)-(E)-2-amino-3,4-dihydroxymethyleicos-6-enoic acid and structure-activity relationships of myriocin derivatives. **Journal of Antibiotics**, v. 47, p. 216-224, 1994b.

GEORGI, A. et al. *Cryptococcus gattii* meningoencephalitis in an immunocompetent person 13 months after exposure. **Infection**, v. 37, n. 4, p. 370-373, Apr. 2009.

GIMENEZ, C. et al. Fungal endophytes and their role in plant protection. **Current Organic Chemistry**, v. 11, n. 8, p. 707-720, May 2007.

GUO, L. et al. Chemical composition, antifungal and antitumor properties of ether extracts of *Scarpania verrucosa* Heeg. And its endophytic fungus *Chaetomium fusiforme*. **Molecules**, v. 13, p. 2114-2125, Sept. 2008.

GRAYBILL, J. R. et al. Diagnosis and management of increased intracranial pressure in patients with AIDS and cryptococcal meningitis. The NIAID Mycoses Study Group and AIDS Cooperative Treatment Groups. **Clinical Infectious Disease**, v. 30, p. 47-54, 2000.

HELLOU, S. et al. Criptococcosis respiratoria en pacientes VIH positivos. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 16, p. 126-129, 1999.

HERRE, E. A. et al. Ecological implications of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. **Ecology**, v. 88, n. 3, p. 550-558, 2007.

HERTWECK, C. Hidden biosynthetic treasures brought to light. **Nature Chemical Biology**, v. 5, p. 450-452, 2009.

HOANG, L. M. et al. *Cryptococcus neoformans* infections at Vancouver hospital and health sciences centre (1997-2002): epidemiology, microbiology and histopathology. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, p. 935-940, 2004.

HORN, W. S. et al. **Antibiotic Eicosenoic Acids**. United States Patent Number 5,233,062, Merck & Co., Inc., Rahway, N. J., 1993.

HOSPENTHAL, D. R.; BENNETT, J. E. Flucitosine monotherapy for cryptococcosis. **Clinical Infectious Disease**, v. 27, p. 260-264, 1998.

HUANG, H. et al. Robust stimulation of humoral and cellular immune responses following vaccination with antigen-loaded beta-glucan particles. **M Bio**, v. 1, n. 3, e00164-10, 2010.

HUSAIN, S.; WAGENER, M. M.; SINGH, N. *Cryptococcus neoformans* infection in organ transplants recipients: variables influencing clinical characteristics and outcome. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 3, p. 375-381, 2001.

HUSTON, S. M.; MODY, C. H. Cryptococcosis: an emerging respiratory mycosis. **Clinics In Chest Medicine**, v. 30, p. 253-264, 2009.

IKEDA, R. et al. Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its application to serotyping of clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 22-29, July 1982.

ILLNAIT-ZARAGOZÍ, M. T. et al. Fatal *Cryptococcus gattii* genotype AFLP5 infection in an immunocompetent Cuban patient. **Medical Mycology Case Reports**, v. 2, p. 48-51, 2013.

JABBOUR, N. et al. Cryptococcal meningitis after liver transplantation. **Transplantation**, v. 61, n. 1, p. 146-149, Jan. 1996.

JARVIS, J. N. et al. Pulmonary cryptococcosis misdiagnosed as smear-negative pulmonary tuberculosis with fatal consequences. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 145, p. e310-e312, Feb. 2010.

JOHNSON, M. D. et al. Combination antifungal therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 693-715, 2004.

JOHNSON, E. M. Issues in antifungal susceptibility testing. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, p. 13-18, Suppl. 1, 2008.

JOHNSON, L. B. et al. Fungaemia due to *Cryptococcus laurentii* and a review of non-neoformans cryptococcaemia. **Mycoses**, v. 41, p. 77-80, 1998.

JOHNSON, M. D.; PERFECT, J. R. Combination antifungal therapy: what can and should we expect? **Bone Marrow Transplantation**, v. 40, p. 297-306, June 2007.

JONES, M. C.; MARSDEN, S. P. Total synthesis of the immunosuppressants myriocin and 2-epi-myriocin. **Organic Letters**, v. 10, n. 18, p. 4125-4128, 2008.

JOSEPH-HORNE, T. et al. Cross-resistance to polyene and azole drugs in *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 1526-1529, 1995.

KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clinical Infectious Disease**, v. 46, p. 120-128, 2008.

KHAN, Z. U. et al. Antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from decayed wood of trunk hollows of *Ficus religiosa* and *Syzygium cumini* trees in north-western India. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p. 312-316, June 2007.

KIDD, S. E. et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island Cryptococcosis: an emerging respiratory mycosis 259 (British Columbia, Canada). **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 101, n. 49, p. 17258-17263, 2004.

KLUEPFEL, D. et al. Myriocin, a new antifungal antibiotic from *Myriococcum albomyces*. **The Journal of Antibiotics**, v. 25, n. 2, p. 109-115, 1972.

KOKTURK, N. et al. Disseminated cryptococcosis in a human immunodeficiency virus-negative patient: a case report. **Mycoses**, v. 48, p. 270-274, 2005.

KURTZMAN. C. P.; FELL. J. W.; BOEKHOUT. T, **The Yeasts: A Taxonomic study**. 5th ed. New York: Elsevier, 2011.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Cryptococcosis. **Medical Mycology**. Philadelphia: Lea & Febiger, p.398-399, 1992.

KWON-CHUNG, K. J. et al. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomyces, Tremellomycetidae). **Taxon**, v. 51, p. 804-806, 2004.

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHECK, I.; BENNETT, J. E. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). **Journal of Clinical Microbiology**, v.15, n. 3, p. 535-537, 1982.

LACAZ, C. S. **Tratado de micologia médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LACAZ, C. S et al. Primary cutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotype B, in an immunocompetent patient. **Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo**, v. 44, n. 4, p. 225-228, 2002.

LAGO, J. H. et al. Chemical and biological evaluation of essential oils from two species of *Myrtaceae* – *Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg). Kausel. **Molecules**, v. 16, n. 12, p. 9827-9837, 2011.

LEIMANN, B. C. Q.; KOIFMAN, R. J. Cryptococcal meningitis in Rio de Janeiro state, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 24, n. 11, p. 2582-2592, Nov. 2008.

LEITE, F. S. **Perfil fenotípico e de expressão de proteínas de *Cryptococcus neoformans* após tratamento com substâncias obtidas da planta *Pterogyne nitens***.113f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – São Paulo. Araraquara, 2010.

LEVY, R. et al. Late presentation of *Cryptococcus gattii* meningitis in a traveler to Vancouver Island: a case report. **The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 197-199, 2007.

LEWIS, R. E. Comparison of Etest, checkerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 345-351, 2002.

LI, Y. et al. Anti-*Helicobacter pylori* substances from endophytic fungal cultures. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 553-558, 2005.

LI, W. C. et al. Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China. **Fungal Diversity**, v. 25, p. 95–106, 2007.

LI, M. et al. Antifungal susceptibilities of *Cryptococcus* species complex isolates from AIDS and non-AIDS patients in Southeast China. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 175-179, 2012.

LIN, X. et al. Endophytic fungi from a pharmaceutical plant, *Camptotheca acuminata*: isolation, identification and bioactivity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 1037-1040, 2007.

LIN et al. Impacto f mating type, serotyping, and ploidy on the virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 7, p. 2923-2938, July 2008.

LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, p. 69-105, May. 2006.

LINDBERG, J. et al. *Cryptococcus gattii* risk for tourists visiting Vancouver island, Canada. **Emerging Infectious Disease**, v. 13, n. 1, p. 178-179. Jan. 2007.

LINDENBERG, A. de S. C. et al. Clinical and epidemiological features of 123 cases os cryptococcosis in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 2, p. 75-78, Mar./Apr. 2008.

LIU, X. et al. Antimicrobial activity of an endophytic Xylaria sp. YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 78, n. 2, p. 241-247, 2008.

LOCKHART, S. R.; HARRIS, J. *Cryptococcus gattii*: clinical importance and emergence in North America. **Current Fungal Infection Reports**, v. 4, p. 151-157, June 2010.

LOPES, J. O. et al. Criptococose não associada à AIDS no Rio Grande do Sul: relato de oito casos e revisão da literatura Sul-riograndense. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, p. 369-372, Set-Out, 1997.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 10, p. 2817-2822, Oct. 1998.

MacDOUGALL, L. et al. Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and detection in the Pacific northwest, USA. **Emerging Infectious Disease**, v. 13, n. 1, p. 42-50, Jan. 2007.

MARQUES, S. A. et al. Primary cutaneous cryptococcosis in Brazil: report of 11 cases in immunocompetent and immunosuppressed patients. **International Journal of Dermatology**, v. 51, n. 7, p. 780-784, 2012.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 5, p. 449-460, 2006.

MARTÍNEZ-LUIS, S. et al. Antileishmanial constituents of the Panamanian endophytic fungus *Edenia* sp. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 12, p. 2011-2014, 2008.

MASCARENHAS-BATISTA, A. V.; SOUZA, N. M.; SACRAMENTO, E. Fatores prognósticos na meningite criptocócica em hospital de referência para doenças infecciosas. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 37, suppl. 1, p. 68-69, 2013.

MATTSSON, R. et al. Feral pigeons as Carrier of *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus uniguttulatus*, and *Debaryomyces hansenii*. **Medical Mycology**, v. 37, p. 367-369, 1999.

McCURDY, L. H.; MORROW, J. D. Ventriculitis due to *Cryptococcus uniguttulatus*. **Southern Medical Journal**, v. 94, n. 1, Jan. 2001.

MENGA, L. et al. Endophytic fungus *Penicillium chrysogenum*, a new source of hypocrellins. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, n. 2, p. 163-165, 2011.

MERCIER, J.; JIMÉNEZ, J. I. Control of fungal decay of apples and peaches by the biofumigant fungus *Muscodor albus*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 31, p. 1-8, 2004.

MICELI, M. H.; DÍAZ, J. A.; LEE, S. A. Emerging opportunistic yeast infections. **Lancet Infection Disease**, v. 11, p. 142-151, Feb. 2011.

MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS – 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 4, p. 515-548, Oct. 1995.

MIYAKE, Y. et al. Serine palmitoiltransferase is the primary target of a shingosine-like immunosuppressant, ISP-1/myriocin. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 211, p. 396-403, 1995.

MOHANTA, J.; TAYUNG, K.; MOHAPATRA, U. B. Antimicrobial potentials of endophytic fungi inhabiting three Ethno-medicinal plants of Similipal Biosphere Reserve, India. **The Internet Journal of Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 1-9, 2008.

MONKS, A. et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor-cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, p. 757-766, 1991.

MOODY, J. A. **Synergism testing. Broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods**, p. 5.18.1–5.18.28. In H. D. Isenberg (ed.), *Clinical microbiology procedures handbook*, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1991.

MORA, D. J. et al. Clinical, epidemiological and outcome features of patients with Cryptococcosis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Mycopathologia**, v. 173, p. 321-327, 2012.

MORENO E. et al. Chemical constituents of the new endophytic fungus *Mycosphaerella* sp. nov. and their anti-parasitic activity. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 6, p. 835-840, 2011.

MUKHERJEE, J.; CLEARE, W.; CASADEVALL, A. Monoclonal antibody mediated capsular reactions (Quellung) in *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Immunological Methods**, v. 184, n. 1, p. 139-143, 1995.

MUKHERJEE, P. K. et al. Combination treatment of invasive fungal infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 1, p. 163-194, 2005.

NAIK, B. S.; SHASHIKALA, J.; KRISHNAMURTHY, Y. L. Diversity of fungal endophytes in shrubby medicinal plants of Malnad region, western Ghats, southern India. **Fungal Ecology**, v. 1, p. 89-93, 2008.

NASCIMENTO, A. M. do et al. Bioactive extracts and chemical constituents of two endophytic strains of *Fusarium oxysporum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 6, p. 1276-1281, 2012.

NASSER, N.; NASSER-FILHO, N.; VIEIRA, A. G. Criptococose cutânea primária em paciente imunocompetente. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 6, p. 1178-1180, 2011.

NATHAN, C. Antibiotics at the crossroads. **Nature**, v. 431, p. 899-902, 2004.

NGUYEN, M. H. et al. Outcomes of central nervous system cryptococcosis vary with host immune function: Results from a multi-center, prospective study. **Journal of Infection**, v. 61, p. 419-426, 2010.

NUCCI, M.; PERFECT, J. R. When primary antifungal therapy fails. **Clinical Infectious Disease**, v. 46, p. 1426-1433, 2008.

OLIVEIRA, F. de M. et al. *Cryptococcus gattii* fungemia: report of a case with lung and brain lesions mimicking radiological features of malignancy. **Revista Instituto Medicina Tropical de São Paulo**, v.49, n. 4, p. 263-265, 2007.

OUATTARA, B. et al. Assessment of antifungal activity of an African medicinal herb *Thonningia sanguinea* against *Cryptococcus neoformans*. **World Applied Sciences Journal**, v. 3, n. 2, p. 191-194, 2008.

PAPPALARDO, M. C. et al. Susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B using time-kill methodology. **Diagnostic Microbiology & Infectious Disease**, v. 64, n. 2, p. 146-151, 2009.

PASQUALOTTO, A. C.; DENNING, D. W. New and emerging treatments for fungal infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, p. i19-i30, Suppl. 1, 2008.

PASTAGIA, M; CAPLIVSKI, D. Disseminated cryptococcosis resulting in miscarriage in a woman without other immunocompromise: a case report. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, p. e-441-443, 2010.

PEDROSO, R. S. et al. The isolation and characterization of virulence factors of *Cryptococcus* spp. from saprophytic in the city of Riberão Preto, São Paulo, Brazil. **Microbiological Research**, *in press* 2007.

PEETERMANS, W. et al. Fluconazole-resistant *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in AIDS patient. **Acta Clinica Belgica**, v. 48, n. 6, p. 405-409.

PEREA, S.; PATTERSON, T. F. Antifungal resistance in pathogenic fungi. **Clinical Infectious Disease**, v. 35, p. 1073-1080, 2002.

PEREIRA, C. B. **Avaliação da produção de melanina em *Cryptococcus neoformans* sob diferentes condições de cultivo e por meio da eletroforese não-desnaturante: influência *in vitro* na atividade de antifúngicos.** 2008. 124f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Alfenas – Minas Gerais. Alfenas, 2008.

PERFECT, J. R. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of America. **Clinical and Infectious Disease**, v. 50, p. 291-322, 2010.

PERFECT, J. R.; COX, G. M. Drug resistance in *Cryptococcus neoformans*. **Drug Resistance Updates**, v. 2, p. 259-269, 1999.

PERKINS, A. et al. Rates of antifungal resistance among spanish clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 144-147, 2005.

PETERS, A. F. Field and culture studies of *Streblonema-Macrocytis* new species *Ectocarpales Phaeophyceae* from Chile, a sexual endophyte of giant kelp. **Phycologia**, v.30, p. 365-377, 1991.

PETRINI, O. et al. Ecology, metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**, v.1, p. 185-196, 1992.

PFALLER, M. A. et al. Global trends in the antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990 to 2004). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2163-2167, 2005.

PHONGPAICHIT, S. et al. Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. **Federation of European Microbiological Societies Immunology and Medical Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 367-372, 2006.

PILLAI, S. K., MOELLERING, Jr, R. C.; ELIOPOULOS, G. M. **Antibiotics in Laboratory Medicine. Antimicrobial Combinations – Chapter 9**, 5 Ed., p. 367-373, Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2005.

PIMENTEL, M. R. et al. The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. **Biotechnology Research International**, 2011, 11p. doi:10.4061/2011/576286

POLAK, A.; HARTMAN, P. G. Antifungal chemotherapy – are we winning? **Progress in Drug Research**, v. 37, p. 181-269, 1991.

PRADO et al. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 513-521, 2009

PRADO, M. A. F. **Determinação do poder rotatório específico do naproxeno e de seu sal sódico** – Aula prática I.9 do Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, 7 p., Dez., 2006.

RAKOTONIRIANA, E. F. et al. Endophytic fungi from leaves of *Centella asiatica*: occurrence and potential interactions within leaves. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 93, p. 27-36, 2008.

RODRIGUEZ, R.; REDMAN, R. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. **Journal of Experimental Botany**, special issue review paper, p. 1-6, Feb. 2008.

ROLSTON, K. V. I. Cryptococcosis due to *Cryptococcus gattii*. **Clinical Infectious Diseases Advance Access Editorial Commentary**. 2013. Doi: 10.1093/Cid/cit342.

ROSA, L. H. et al. Leishmanicidal, trypanocidal, and cytotoxic activities of endophytic fungi associated with bioactive plants in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 420-430, 2010.

ROSARIO, I.; ACOSTA, B.; COLOM, F. La paloma y otras aves como reservorio de *Cryptococcus* spp. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, p. S13-S18, 2008.

ROZEMBAUM, R.; GONÇALVES, R. Clinical epidemiological study of 171 cases cryptococcosis. **Clinical Infectious Disease**, v. 18, p. 369-380, 1994.

RUBINI, M. R. et al. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. **Internation Journal of Biological Sciences**, Lake Haven, v. 1, p. 24-33, 2005.

RUIZ-CAMPS, I.; CUENCA-ESTRELLA, M. Antifúngicos para uso sistémico. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 27, n. 6, p. 353-362, 2009.

SAAG, M. S. et al. Comparison of amphotericin B with fluconazole in the treatment of acute aids-associated cryptococcal meningitis. The NIAID mycoses study group and the aids clinical trials group. **New England Journal of Medicine**, v. 326, n. 2, p. 83–89, 1992.

SAAG, M. S. et al. Practice guidelines for the management of cryptococcal diseases. **Clinical Infectious Disease**, v. 30, n. 4, p. 710-718, 2000.

SAIKKONEN, K. et al. Evolution of endophyte-plant symbioses. **TRENDS in Plant Science**, v. 9, n. 6, p. 275-280, 2004.

SANO, S. et al. Asymmetric total synthesis of ISP-I (Myriocin, thermozymocidin), a potent immunosuppressive principle in the *Isaria sinclairii* metabolite. **Tetrahedron Letters**, v. 36, n. 12, p. 2097-2100, 1995.

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.

SAR, B. et al. Increasing in vitro resistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* Cambodian isolates: April 2000 to march 2002. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 54, p. 563-565, 2004.

SCHULZ, B. et al. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research** , v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.

SCHWARZ, P. et al. Efficacy of amphotericin B in combination with flucytosine against flucytosine-susceptible or flucytosine-resistant isolates of *Cryptococcus neoformans* during disseminated murine cryptococcosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 113-120, 2006.

SCORZONI, L. et al. The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp. and *Cryptococcus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 391-397, 2007.

SEVERO, C. B. Cryptococcosis in children. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 10, p. 166-171, 2009.

SHARON, A. Fungal apoptosis: function, genes and gene function. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews**, v. 33, p. 833-854, 2009.

SHOEMAKER, R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, p. 813-823, 2006.

SHOHAM, S.; MARR, K. A. Invasive fungal infections in solid organ transplant recipients. **Future Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 639-655, 2012.

SHWETA, S. et al. Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. Ex Arn (*Icacinaceae*) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin. **Phytochemistry**, v. 71, p. 117-122, 2010.

SILVA, P. R. da et al. Suscetibilidade a antifúngicos de variedades de *Cryptococcus neoformans* isoladas de pacientes em hospital universitário. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 2, p. 158-162, 2008.

SILVA, P. **Farmacologia**. 8ª Ed. Edited by Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2010.

SOARES, B. M. et al. Cerebral infection caused by *Cryptococcus gattii*: a case report and antifungal susceptibility testing. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 25, p. 242-245, 2008.

STEENBERGEN, J. N.; CASADEVALL, A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Microbes and Infection**, v.5, p.667-675, 2003.

STEFANELLO, M. E. A. et al. Essential oils from neotropical *Myrtaceae*: chemical diversity and biological properties. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, n. 1, p. 73-94, 2011.

STONE, J. K.; BACON, C. W.; WHITE, J. F. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: C. W. BACON & J. F. WHITE (Ed.) **Microbial Endophytes**. New York: Marcel Dekker. pp. 3-30, 2000.

STRADER, C. R. **Fingolimod (Gilenya; FTY720): A recently approved multiple sclerosis drug based on a fungal secondary metabolite and the creation of a natural products pure compound database and organized storage system**. 78f. Thesis for the Degree Master of Science – The University of North Carolina at Greensboro – Greensboro, 2012.

STROBEL, G. A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 315-333, 2002.

STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, Paris, v.5, p. 534 - 535, 2003.

STROBEL, G. A.; DAISY B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 491-502, 2003.

STROBEL, G. et al. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 257-268, June 2004.

SUN, P. et al. Structural and stereochemical studies of hydroxyanthraquinone derivatives from the endophytic fungus *Coniothyrium* sp. **Chirality**, v. 25, n. 2, p. 141-148, 2013.

SUN, Z. et al. Antifungal and cytotoxic activities of the secondary metabolites from endophytic fungus *Massrisson* sp. **Phytomedicine**, v. 18, p. 859-862, 2011.

SUPAPHON P. et al. Antimicrobial potential of endophytic fungi derived from three seagrass species: *Cymodocea serrulata*, *Halophila ovalis* and *Thalassia hemprichii*. **PLoS ONE**, v. 8, 8 p., e72520, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0072520.

TAMURA, K. et al. MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology Evolution**, v. 28, p. 2731-2739.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Products Reports**, v. 18, p. 448-459, 2001.

TEIXEIRA, M. C. A. et al. A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species. **Parasitology Research**, v. 88, p. 963-968, 2002.

TIANPANICH, K. et al. Radical scavenging and antioxidant activities of isocoumarins and a phthalide from the endophytic fungus *Colletotrichum* sp. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 1, 79-81, 2011.

TRILLES, L. et al. *In vitro* antifungal susceptibility of *Cryptococcus gattii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4815-4817, Oct. 2004.

UNAIDS. **Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2012**. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. 212 p. 2012. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Disponível em: <www.unaids.org>

UPTON, A. et al. First contemporary case of human infection with *Cryptococcus gattii* in Puget sound: evidence for spread of the Vancouver Island outbreak. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 3086-3088, Sept. 2007.

VÁSQUEZ, L. A. et al. Criptococosis cutánea: manifestación inicial de una infección diseminada em un paciente con transplante renal. **Revista de La Asociación Colombiana de Dermatología & Cirugía Dermatológica**, v. 16, n. 2, p. 91-93, 2008.

VAZ, A. B. M. et al. Diversity and antimicrobial activity of fungal endophyte communities associated with plants of Brazilian savanna ecosystems. **African Journal of Microbiology Research**, v. 55, p. 62-70, 2012.

VELAGAPUDI, R. et al. Spore as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 10, p. 4345-4355, Oct. 2009.

VENKATESWARLU, K. et al. Fluconazole tolerance in clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, p. 748-751, 1997.

VERZA, M. et al. Biotransformation of a tetrahydrofuran lignan by endophytic fungus *Phomopsis* sp. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 1, p. 195-200, 2009.

VIEIRA, M. L. A. et al. Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell. (Solanaceae). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 58, p. 54-66, 2012.

VIVAS, J. et al. Sinergismo *in vitro* entre hidrazonas, ajoeno y posaconazol sobre aislados de *Cryptococcus* spp. **Investigación Clínica**, v. 52, n. 4, p. 312-322, 2011.

VIVIANI, M. A. et al. Molecular analysis of 311 *Cryptococcus neoformans* isolates from a 30-month ECMM (European Confederation of Medical Mycology) survey of cryptococcosis in Europe. **Federation of European Microbiological Societies Yeasts Research**, v. 6, p. 614-619, 2006.

WANG, Y., AISEN, P.; CASADEVALL, A. Melanin, melanin “ghosts”, and melanin composition in *Cryptococcus neoformans*. **American Society for Microbiology**, v. 64, n. 7, p. 2420-2424, 1996.

WHO, 2008. **Programs and projects – traditional medicine**, fact sheet n°134, Dec. 2008
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>> Acesso em: 18 de março de 2009.

WILSON, D. E.; BENNETT, J. E.; BAILEY, J. W. Serologic grouping of *Cryptococcus neoformans*. **Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 127, p. 820-823, 1968.

YEE-CHUN, C. et al. Clinical features and *in vitro* susceptibilities of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 36, n. 3, p. 175-183, 2000.

YU, H. et al. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. **Microbiological Research**, v. 165, p. 437-449, 2010.

ZARAGOZA, O. et al. Process analysis of variables for standardization of antifungal susceptibility testing of nonfermentative yeasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 4, p. 1563-1570, Jan. 2011.

ZHU, L. et al. Case report. Pulmonary cryptococcosis associated with cryptococcal meningitis in non-AIDS patients. **Mycoses**, v. 45, p. 111-117, 2002.

ZILLA, M. K. et al. Bioactive metabolites from an endophytic *Cryptosporiopsis* sp. inhabiting *Clidemia hirta*. **Phytochemistry**, 2013.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.06.021>

ANEXOS

ANEXO A

Preparo do meio RPMI 1640 suplementado com glicose e MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico)

1. Dissolver sob agitação os componentes do meio RPMI 1640 suplementado com 2,0 % de glicose e 0,165 mol/L de MOPS em 900,0 mL de água destilada esterilizada;
2. Ajustar o pH a 7,0 com NaOH 1,0 M a temperatura ambiente (25° C);
3. Adicionar água destilada até completar o volume para 1 litro, esterilizar por filtração em membrana 0,22 µm e armazenar em geladeira (10° C).

ANEXO B

Solução do corante “methyl thiazolyl tetrazolium” (MTT) a 5,0 mg/mL

Para 40 mL de solução:

1. Em tubo Falcon de 50,0 mL pesar 200,0 mg do corante MTT;
2. Adicionar 40,0 mL de água destilada estéril;
3. Misturar até completa dissolução, caso necessário utilizar ultrassom;
4. Manter congelado em freezer.

ANEXO C

Solução de dodecilsulfato de sódio (SDS) em álcool isopropílico e água com pH 5,4

Para 1 L de solução:

1. Pesar 100,0 g de SDS;
2. Adicionar 400,0 mL de água destilada e misturar até solubilizar o SDS;
3. Adicionar 500,0 mL de álcool Isopropílico (P.A.);
4. Ajustar o pH para 5,4 com solução de NaOH 10,0 M, completar o volume para 1,0 L com álcool isopropílico e transferir para frasco de vidro;
5. Manter o frasco bem fechado, ao abrigo da luz e em geladeira entre 2 e 8°C).

ANEXO D

Soluções reveladoras para CCD

Para 100,0 mL de solução de vanilina a 10,0 %

1. Pesar 10,0 g de vanilina;
2. Adicionar 100,0 mL de álcool etílico P.A;
3. Misturar até completa dissolução.

Para 100,0 mL de solução de ácido sulfúrico a 10,0 %

1. Em proveta aliquotar 90,0 mL de álcool etílico P.A e resfriar em banho de gelo;
2. Em proveta aliquotar 10,0 mL de ácido sulfúrico P.A;
3. Transferir e misturar cuidadosamente o ácido no etanol.

ANEXO E

Espectros de U.V., Massas, Perfil de fragmentação e RMN da substância **1**

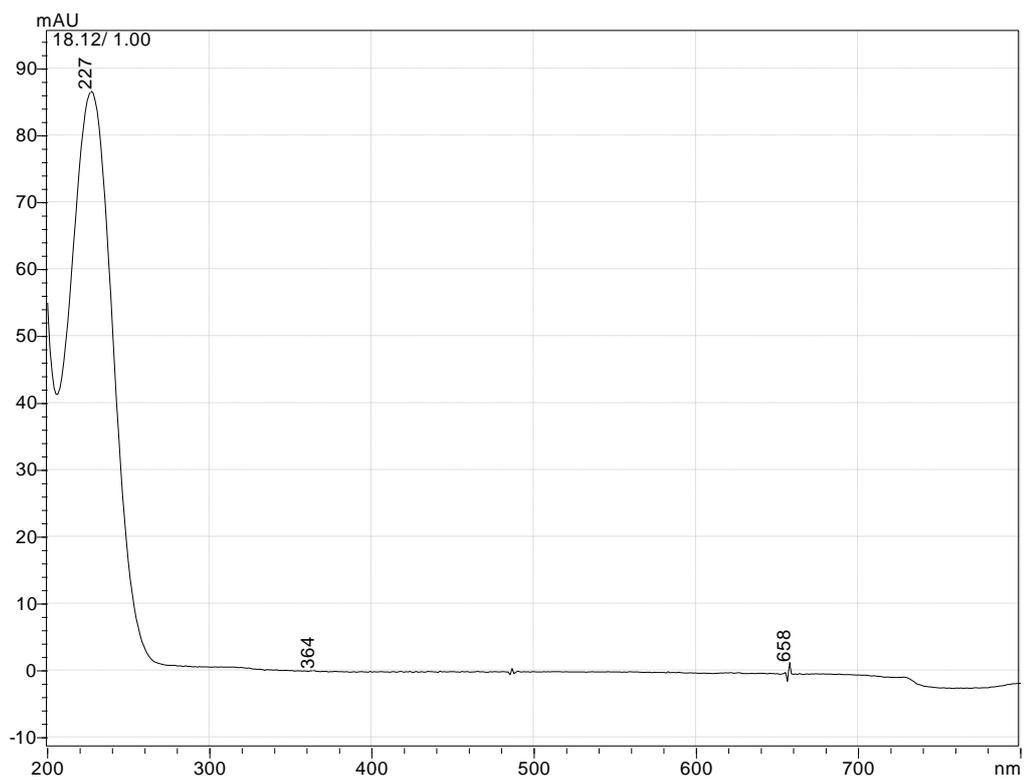
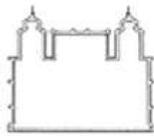


Fig. 30 – Espectro no U.V. da substância **1** (200-800 nm).

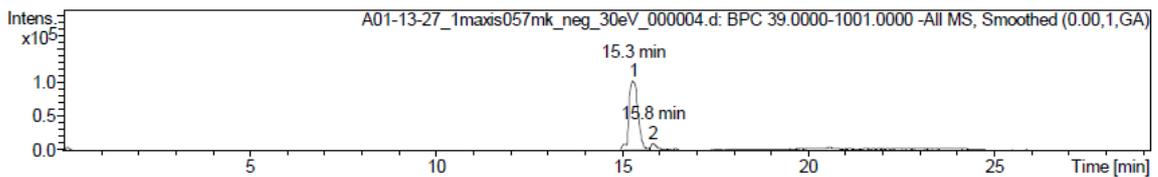


Sample Spectra Overview

Sample Name **A01-13-27_1maxis057mk_pos_30eV_000004_1to100** Acquisition Date: 2/1/2013 10:57:31 AM

Comment Client: CPqRR/LQPN/Christiane
 Sample type: Natural Products
 LC-gradient: 1-100% ACN in 12.5min

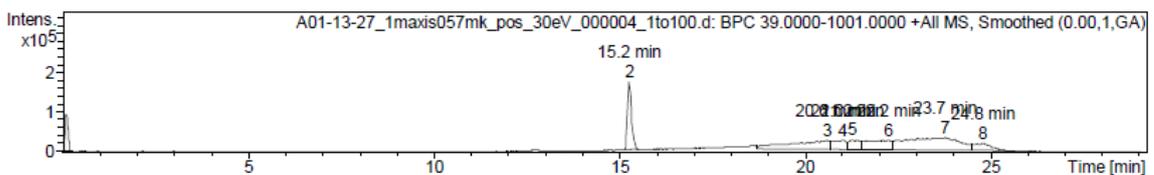
Vial content solved in 800ul MeOH
 injection: 10ul



Formulas of Impurities

#	Compound	m/z.meas.	m/z.calc.	Error [ppm]	Error [mDa]	mSigma	Formula	
1	Cmpd 1, 917.0 s	398.254532	398.2548	0.7	0.3	5.7	C 21 H 36 N 1 O 6	
			398.2561	4.1	1.6	9.2	C 22 H 32 N 5 O 2	
			398.2535	-2.7	-1.1	10.1	C 18 H 28 N 11	
		797.516419	797.5169	0.6	0.5	6.4	C 42 H 73 N 2 O 12	
			797.5142	-2.8	-2.2	10.0	C 38 H 69 N 8 O 10	
			797.5156	-1.1	-0.9	10.3	C 39 H 65 N 12 O 6	
			797.5182	2.3	1.8	16.6	C 43 H 69 N 6 O 8	
			797.5129	-4.5	-3.6	17.2	C 35 H 61 N 18 O 4	
			797.5142	-2.8	-2.2	17.4	C 36 H 57 N 22	
			797.5129	-4.4	-3.5	19.2	C 37 H 73 N 4 O 14	
2	Cmpd 2, 949.0 s	410.254496	410.2548	0.8	0.3	10.1	C 22 H 36 N 1 O 6	
			410.2535	-2.5	-1.0	16.4	C 19 H 28 N 11	
		478.241649	478.2406	-2.2	-1.0	17.8	C 18 H 24 N 17	
			821.515885	821.5129	-3.7	-3.0	10.5	C 37 H 61 N 18 O 4
			821.5142	-2.0	-1.7	12.8	C 38 H 57 N 22	
			821.5142	-2.0	-1.7	14.8	C 40 H 69 N 8 O 10	
821.5156	-0.4	-0.3	15.9	C 41 H 65 N 12 O 6				

Note: mSigma fits < 50 indicates high probability of correct formula

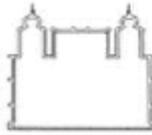


Formulas of Impurities

#	Compound	m/z.meas.	m/z.calc.	Error [ppm]	Error [mDa]	mSigma	Formula
1	Cmpd 1, 6.0 s	158.964080	158.9649	4.9	0.8	12.7	C 1 N 2 Na 1 O 6
2	Cmpd 2, 914.8 s	400.269613	400.2680	-4.0	-1.6	16.7	C 18 H 30 N 11
			400.2694	-0.6	-0.2	17.0	C 21 H 38 N 1 O 6
			400.2683	-3.3	-1.3	18.5	C 20 H 35 N 5 Na 1 O 2
7	Cmpd 7, 1424.1 s	172.094607	172.0941	-2.7	-0.5	14.9	C 4 H 10 N 7 O 1

Note: mSigma fits < 50 indicates high probability of correct formula

Fig. 31 – Espectro de Massas da substância 1 (A01.13.27): mK_neg_30eV e mK_pos_30eV.



Accurate Mass Report

Sample Name **A001-13-27** Acquisition Date: 5/17/2013 8:52:38 AM
Comment Client: CPqRR/LQPN/Cristiane Instrument: maXis ETD
Sample type: natural product
Purity: single HPLC peak

sample (0.2-1mg/ml) diluted 1:10 in 50% MeOH, 0.1% HFO

Method mk_direkt-infusion_small-compounds_75-1000_neg.m
Data Path D:\Data\Acquisition_neg\A001-13-27\A001-13-27_1maxis073mk_neg_MS2(398-30eV).d

Acquisition Parameter

Parameter	Value	Parameter	Value	Parameter	Value
Ion Polarity	Negative	Scan Mode	MS/MS (MRM)	Used Reference MassList	Na Formate (neg)
Scan Begin	75 m/z	isCID Energy	0.0 eV	TOF Calibration Mode Version	Version 1
Scan End	1000 m/z	Collision Energy	-30.0 eV	TOF1 Calibration Mode	Quadratic + HPC
Source Type	ESI	Set Ion Cooler RF	25.0 Vpp	TOF1 Calibration Standard	0.1
Set End Plate Offset	-500 V	Set Ion Cooler Transfer	49.0 µs	Deviation in PPM	
Set Capillary	4500 V	Time		TOF2 Calibration Mode	-1
Nebulizer	0.4 Bar	Set Ion Cooler Pre Pulse	7.0 µs	TOF2 Calibration Standard	0.1
Dry Gas	4.0 l/min	Storage Time		Deviation in PPM	
Dry Heater	180 °C				
Set Divert Valve	Waste	Rolling Averages	3 Off		

Results

Meas. m/z	#	Formula	Score	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	mSigma	rdb	e ⁻ Conf	N-Rule
104.0351	1	C 3 H 6 N O 3	100.00	104.0353	1.8	1.9	4.4	1.5	even	ok
127.1124	1	C 8 H 15 O	100.00	127.1128	3.8	3.8	50.0	1.5	even	ok
332.2226	1	C 20 H 30 N O 3	100.00	332.2231	1.6	1.9	18.4	6.5	even	ok
	2	C 18 H 28 N 4 O 2	85.14	332.2218	-2.4	-2.2	19.7	7.0	odd	ok

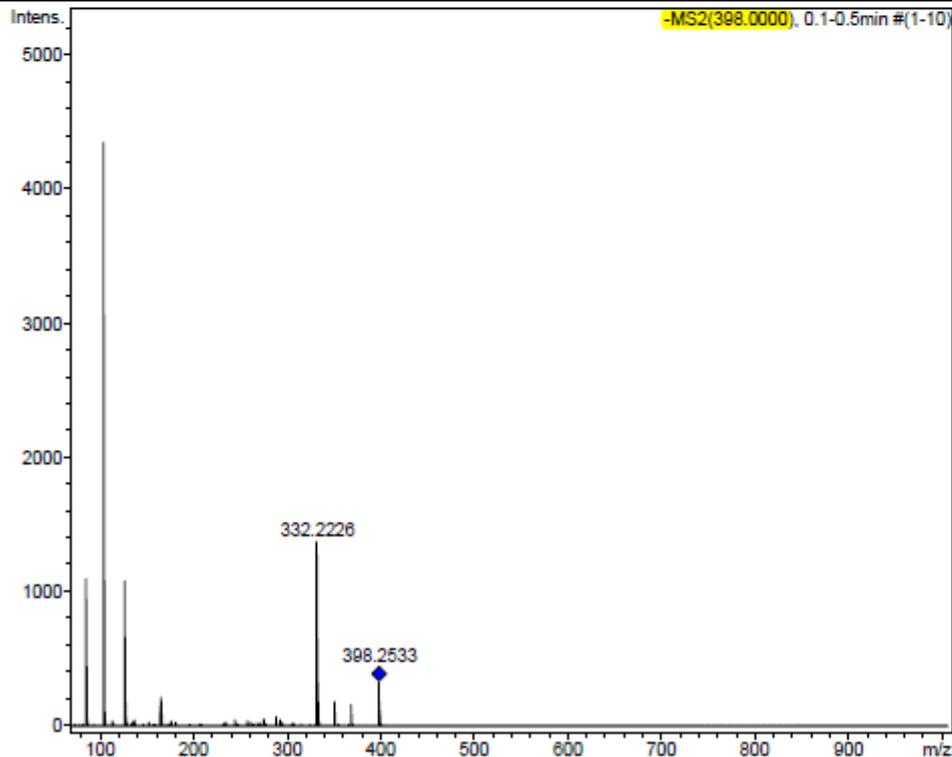
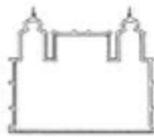


Fig. 32 – Perfil de fragmentação da substância 1 (A01.13.27) – perfil 1.



Ministério da Saúde
 Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de Pesquisas René Rachou
 Av. Augusto de Lima, 1715 – Bairro Barro Preto
 39100-002 Belo Horizonte – MG – BRASIL
 Tel.: (31) 3349-7700 – FAX: (31) 3295-3115



Accurate Mass Report

Sample Name **A001-13-27** Acquisition Date: 5/17/2013 3:46:47 PM
 Comment Client: CPqRR/LQPN/Cristiane Instrument: maXis ETD
 Sample type: natural product
 Purity: single HPLC peak

sample (0.2-1mg/ml) diluted 1:10 in 50% MeOH, 0.1% HFO

Method mk_direkt-infusion_small-compounds_75-1000_pos.m
 Data Path D:\Data\Acquisition_neg\A001-13-27\A001-13-27_1maxis073mk_pos_MS2(400-30eV).d

Acquisition Parameter

Ion Polarity	Positive	Scan Mode	MS/MS (MRM)	Used Reference MassList	Na Formate (pos)
Scan Begin	75 m/z	isCID Energy	0.0 eV	TOF Calibration Mode Version	Version 1
Scan End	1000 m/z	Collision Energy	30.0 eV	TOF1 Calibration Mode	Quadratic + HPC
Source Type	ESI	Set Ion Cooler RF	25.0 Vpp	TOF1 Calibration Standard	0.2
Set End Plate Offset	-500 V	Set Ion Cooler Transfer	45.0 µs	Deviation in PPM	
Set Capillary	4500 V	Time		TOF2 Calibration Mode	Enhanced Quadratic
Nebulizer	0.4 Bar	Set Ion Cooler Pre Pulse	7.0 µs	TOF2 Calibration Standard	0.1
Dry Gas	4.0 l/min	Storage Time		Deviation in PPM	
Dry Heater	180 °C				
Set Divert Valve	Waste	Rolling Averages	3 Off		

Results

Meas. m/z	#	Formula	Score	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	mSigma	rdb	e ⁻ Conf	N-Rule
90.0551	1	C 3 H 8 N O 2	100.00	90.0550	-2.1	-2.1	21.0	0.5	even	ok
104.0345	1	C 3 H 6 N O 3	100.00	104.0342	-2.8	-2.8	21.2	1.5	even	ok
113.0965	1	C 7 H 13 O	100.00	113.0961	-3.2	-3.2	2.6	1.5	even	ok
265.2172	1	C 17 H 29 O 2	100.00	265.2162	-3.7	-3.7	11.6	3.5	even	ok
318.2440	1	C 20 H 32 N O 2	100.00	318.2428	-3.9	-3.9	21.3	5.5	even	ok
382.2605	1	C 21 H 36 N O 5	56.64	382.2588	-4.3	-4.4	24.4	4.5	even	ok
	2	C 22 H 32 N 5 O	100.00	382.2601	-0.8	-0.9	32.6	9.5	even	ok
400.2711	1	C 21 H 38 N O 6	49.69	400.2694	-4.3	-4.3	22.4	3.5	even	ok
	2	C 22 H 34 N 5 O 2	100.00	400.2707	-0.9	-1.0	25.8	8.5	even	ok
	3	C 25 H 35 N 3 Na	47.69	400.2723	3.1	3.0	37.1	9.5	even	ok

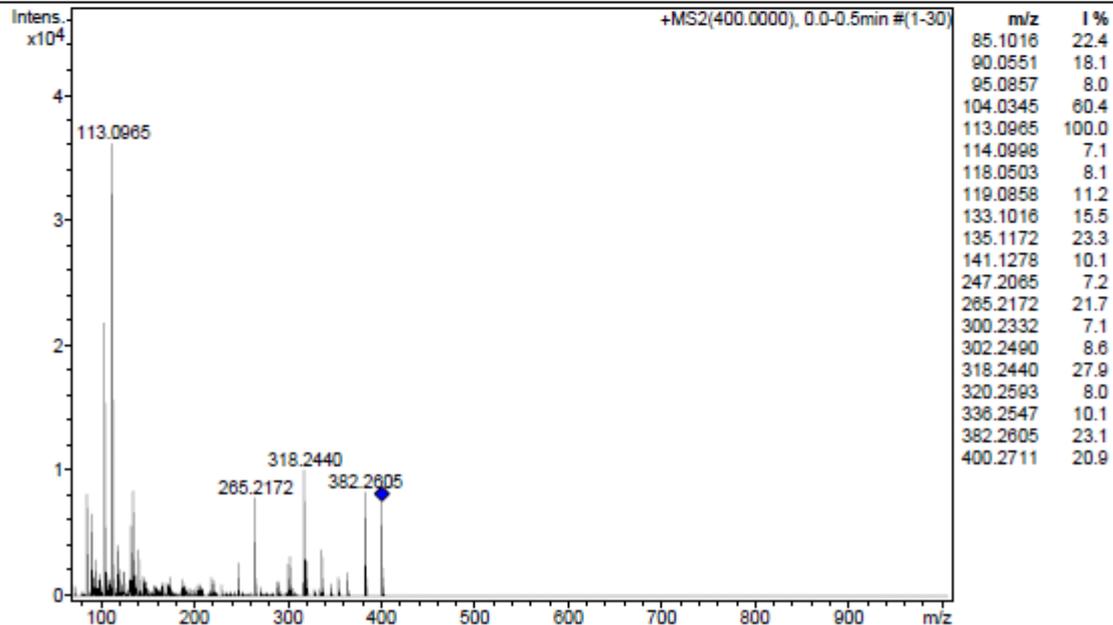


Fig. 33 – Perfil de fragmentação da substância 1 (A01.13.27) – perfil 2.

A 001 13-27 - Cris Bigatti
Op. Eliane

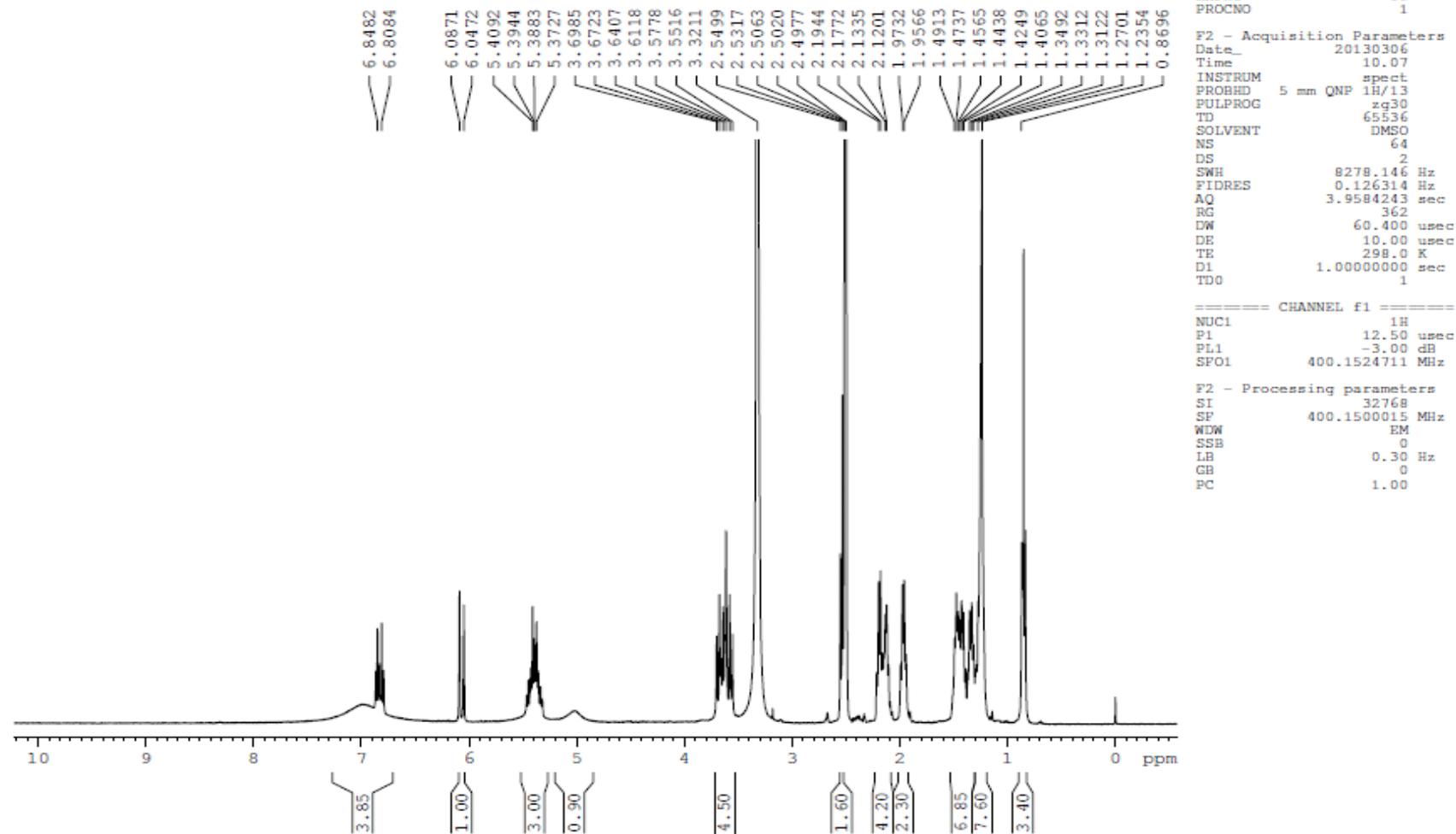
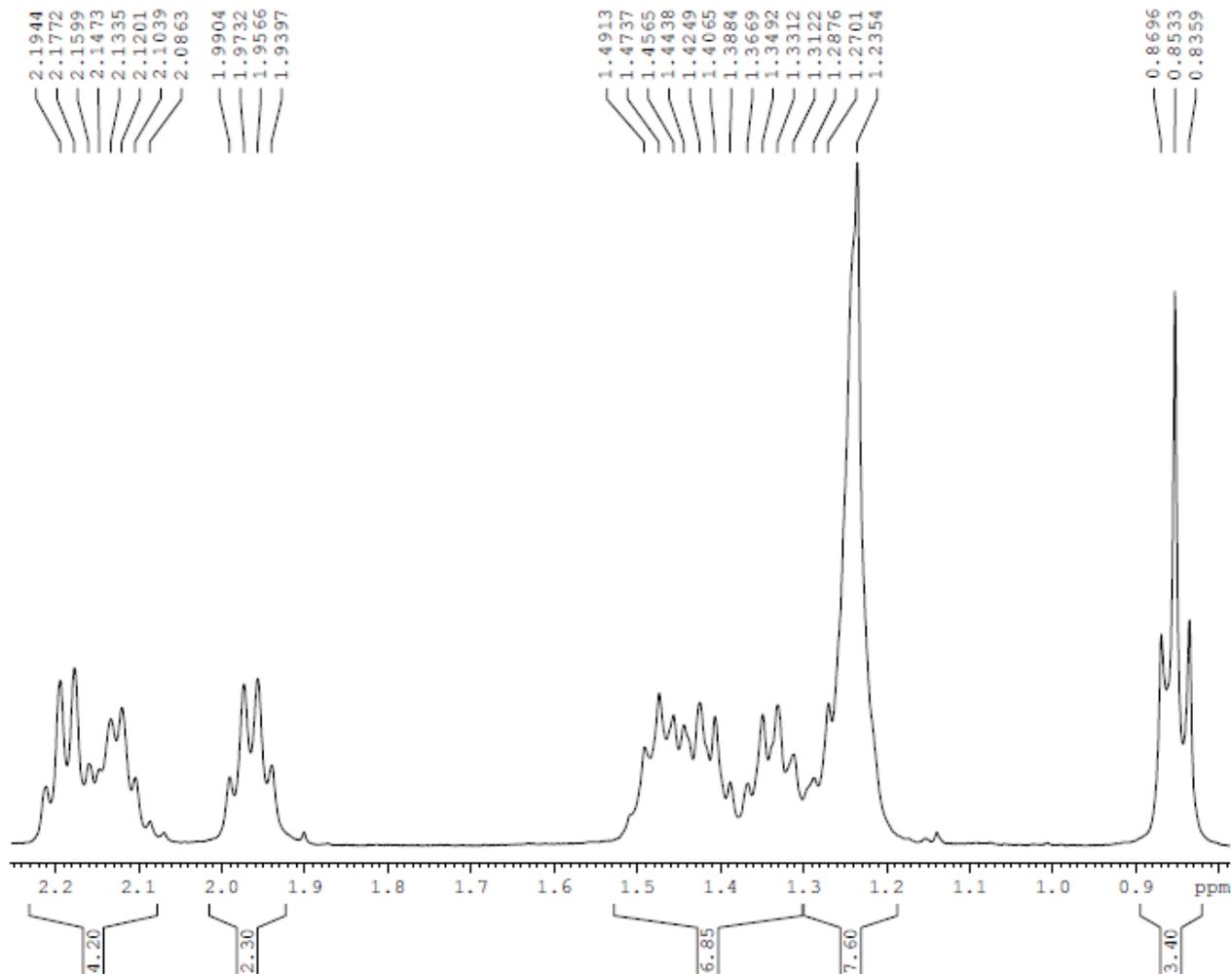


Fig. 34 – Espectro de RMN de ^1H da substância **1** - A001.13.27 (400 MHz, DMSO, δ).

A 001 13-27 - Cris Bigatti
Op. Eliane



Current Data Parameters
NAME cpqrr03130168
EXPNO 10
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20130306
Time 10.07
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT DMSO
NS 64
DS 2
SWH 8278.146 Hz
FIDRES 0.126314 Hz
AQ 3.9584243 sec
RG 362
DW 60.400 usec
DE 10.00 usec
TE 298.0 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 12.50 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 400.1524711 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 400.1500015 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

Fig. 35 – Ampliação 1 do espectro de RMN de ^1H da substância **1** - A001.13.27 (400 MHz, DMSO, δ).

A 001 13-27 - Cris Bigatti
Op. Eliane

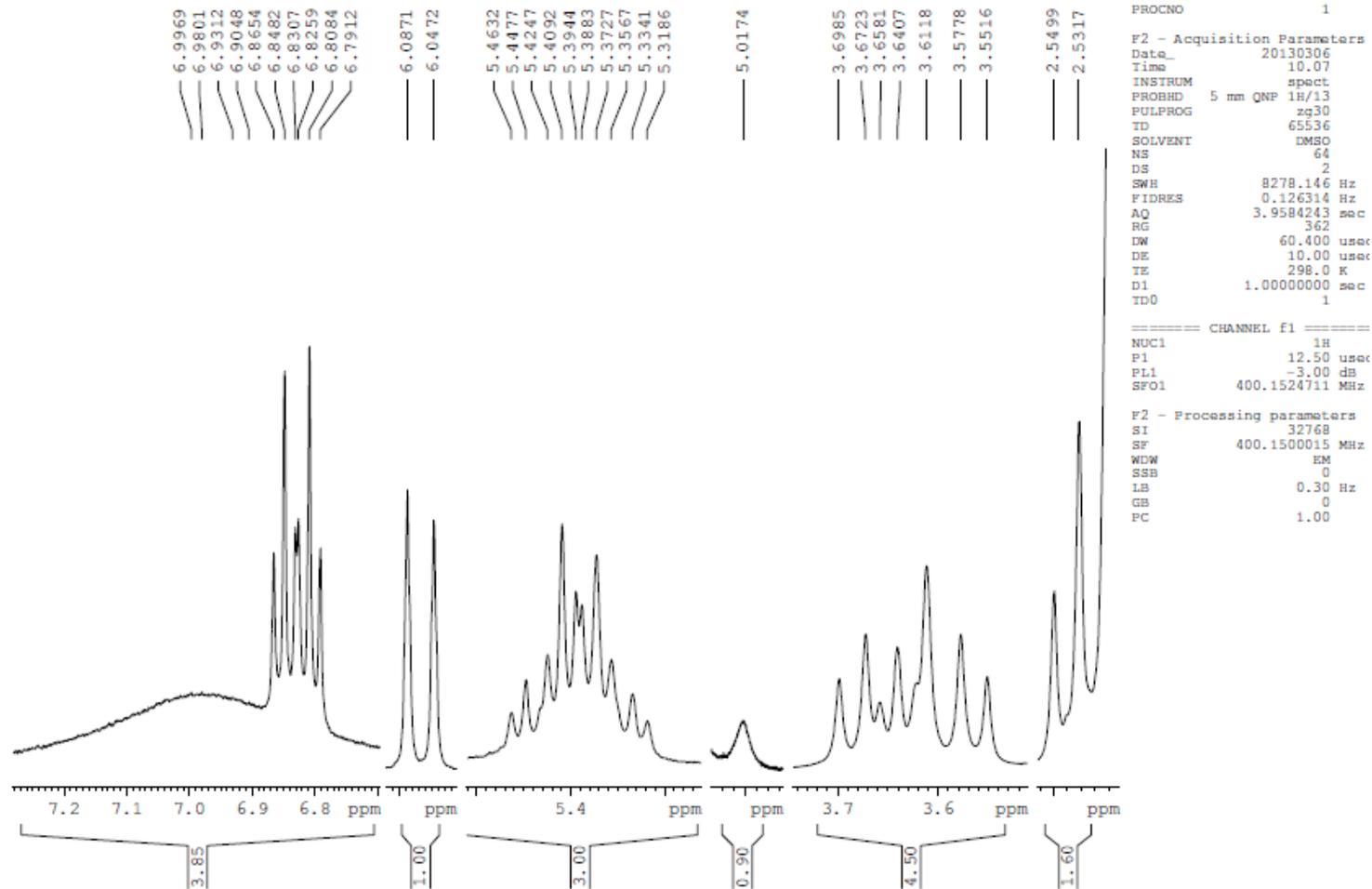


Fig. 36 – Ampliação 2 do espectro de RMN de ^1H da substância **1** - A001.13.27 (400 MHz, DMSO, δ).

A 001 13-27 - Cris Bigatti
Op. Eliane

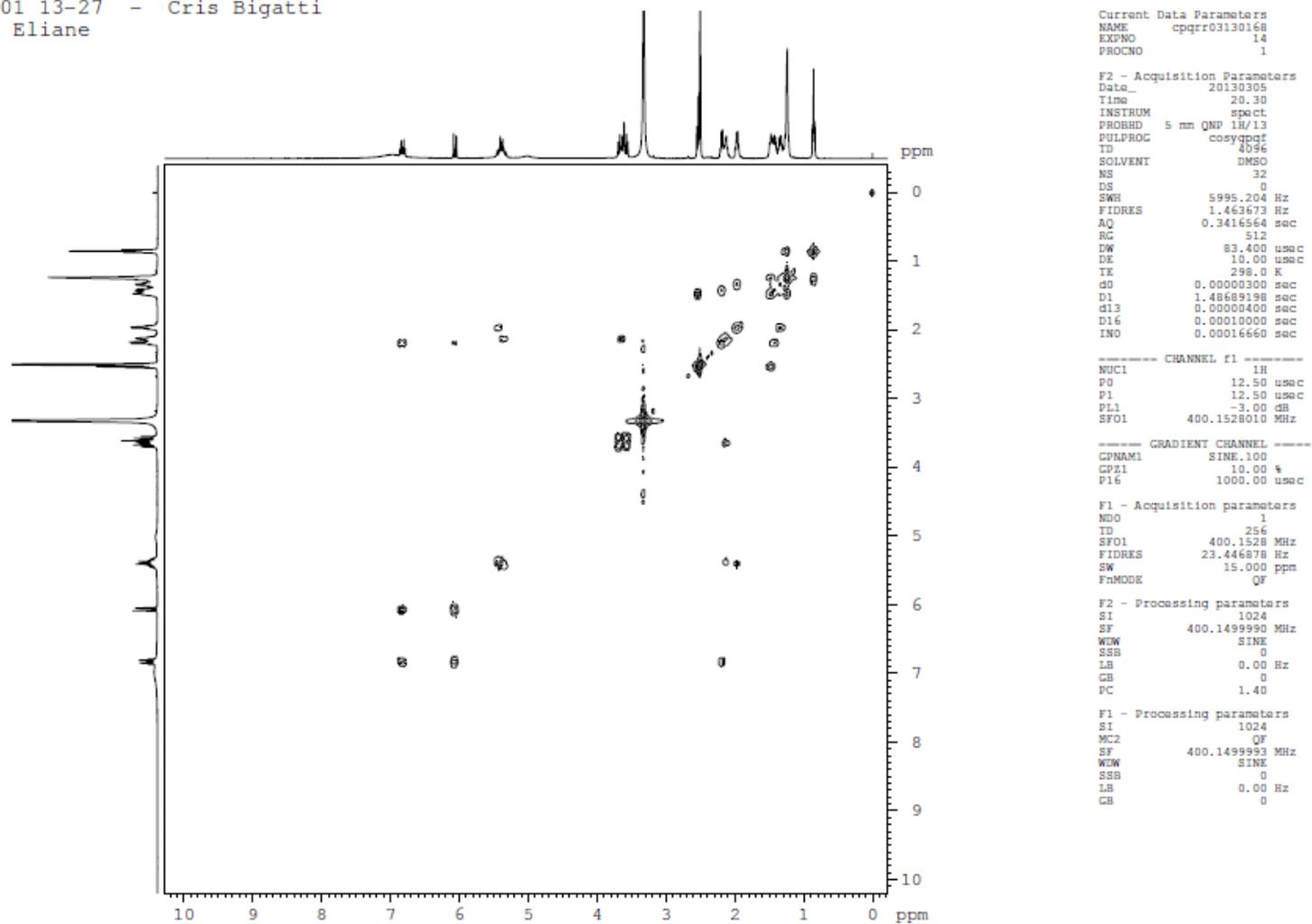


Fig. 37 – Mapa de contornos COSY da substância **1** - A001.13.27 (400 MHz, DMSO, δ).

A 001 13-27 - Cris Bigatti
Op. Eliane

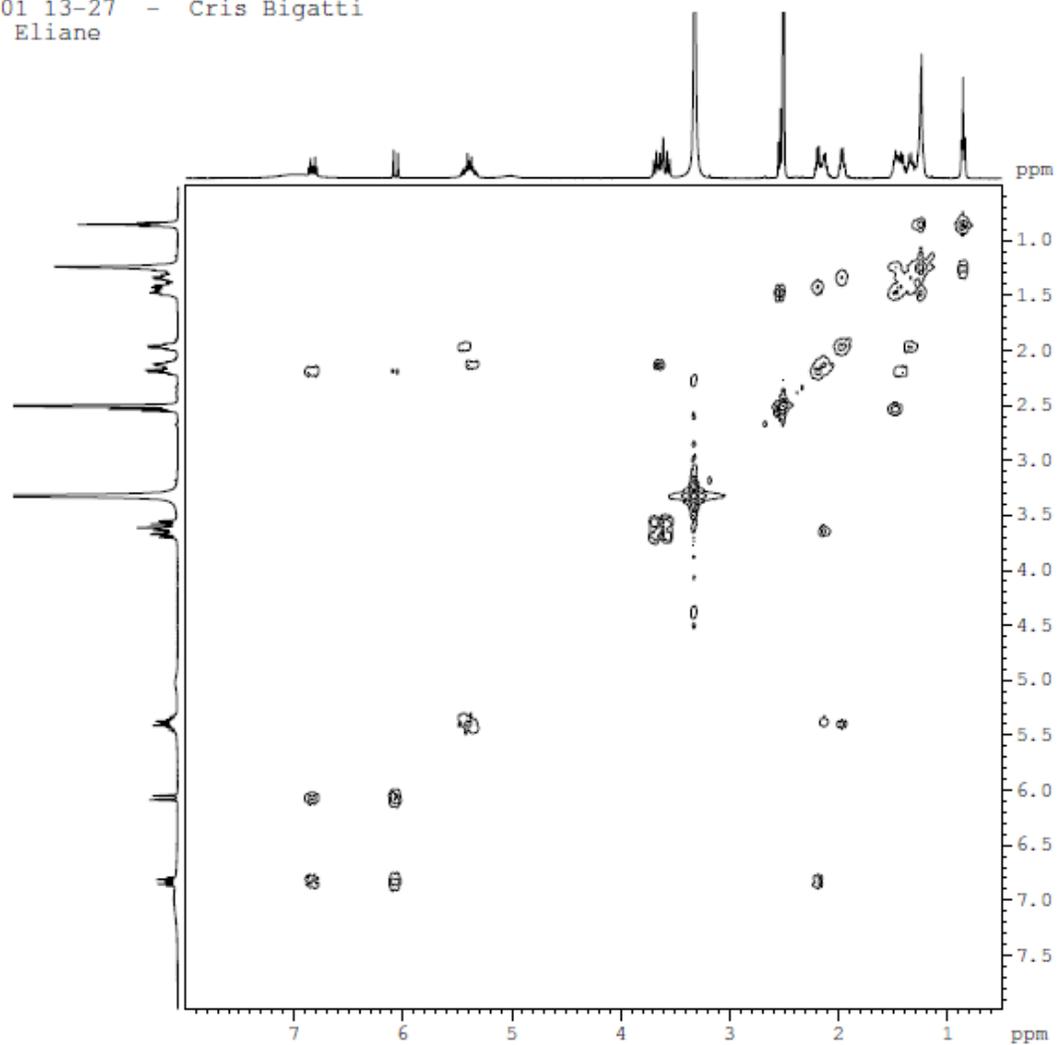


Fig. 38 – Ampliação 1 do mapa de contornos COSY da substância **1** - A001.13.27 (400 MHz, DMSO, δ).

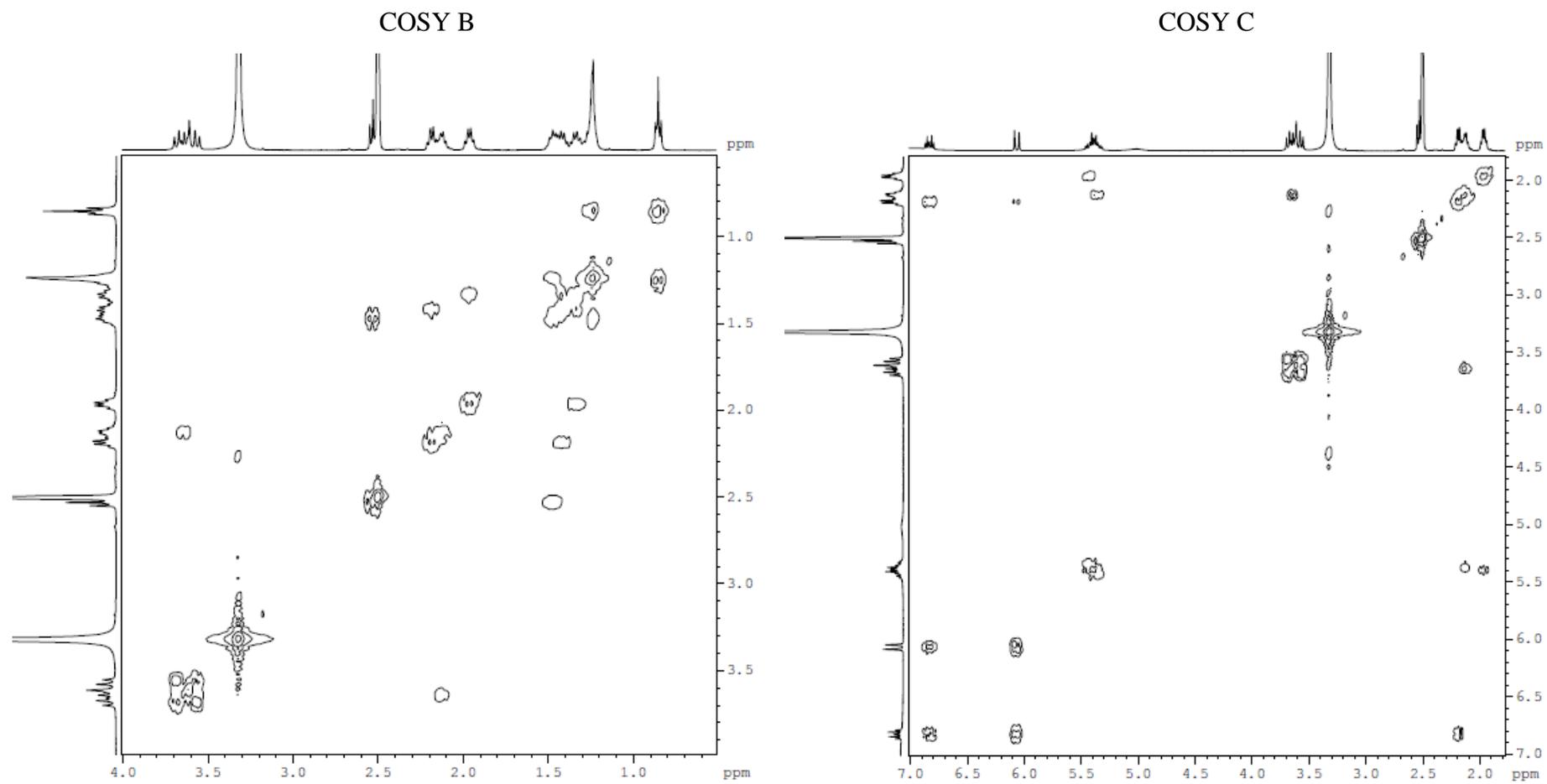


Fig. 39 – Ampliação 2 (COSY B) e 3 (COSY C) do mapa de contornos COSY da substância **1** - A001.13.27 (400 MHz, DMSO, δ).

A 001 13-27 - Cris Bigatti
Op. Eliane

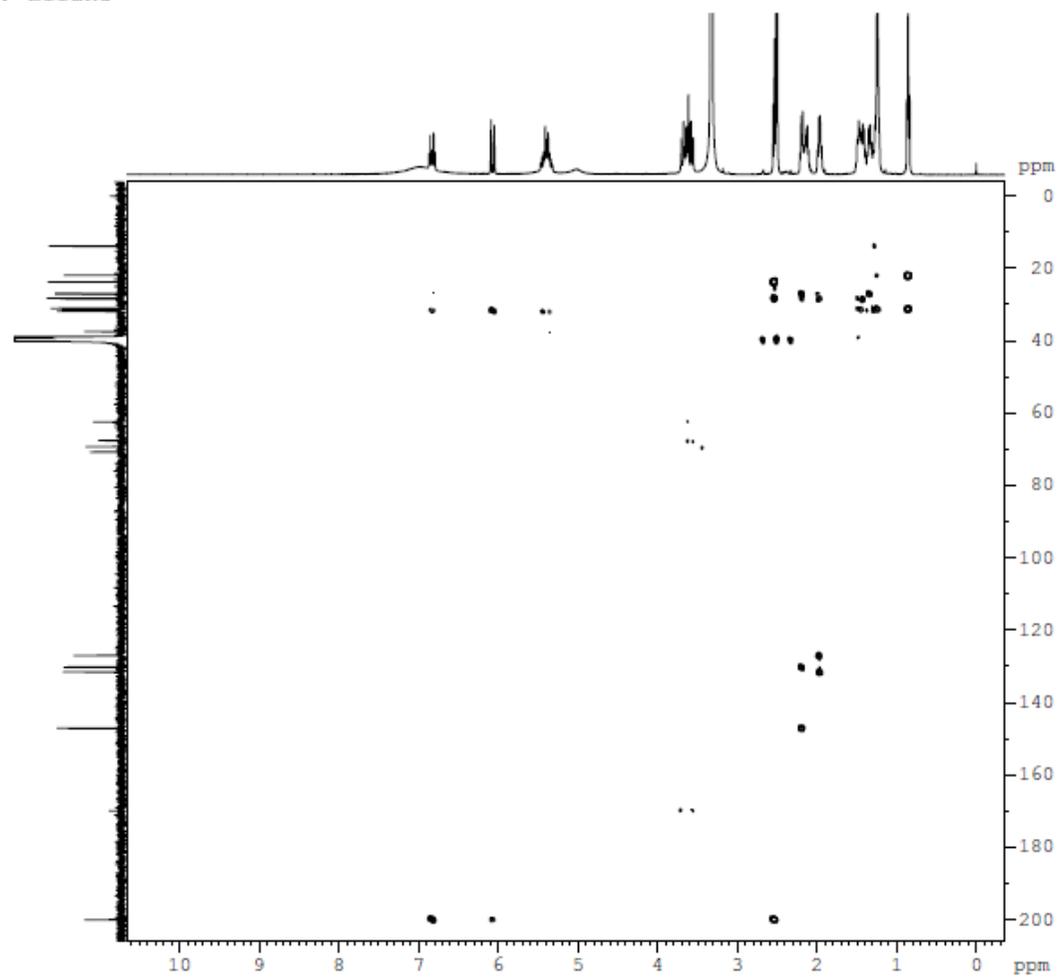


Fig. 40 – Espectro de HMBC da substância **1** – A 001.13.27 (400 MHz, DMSO, δ).

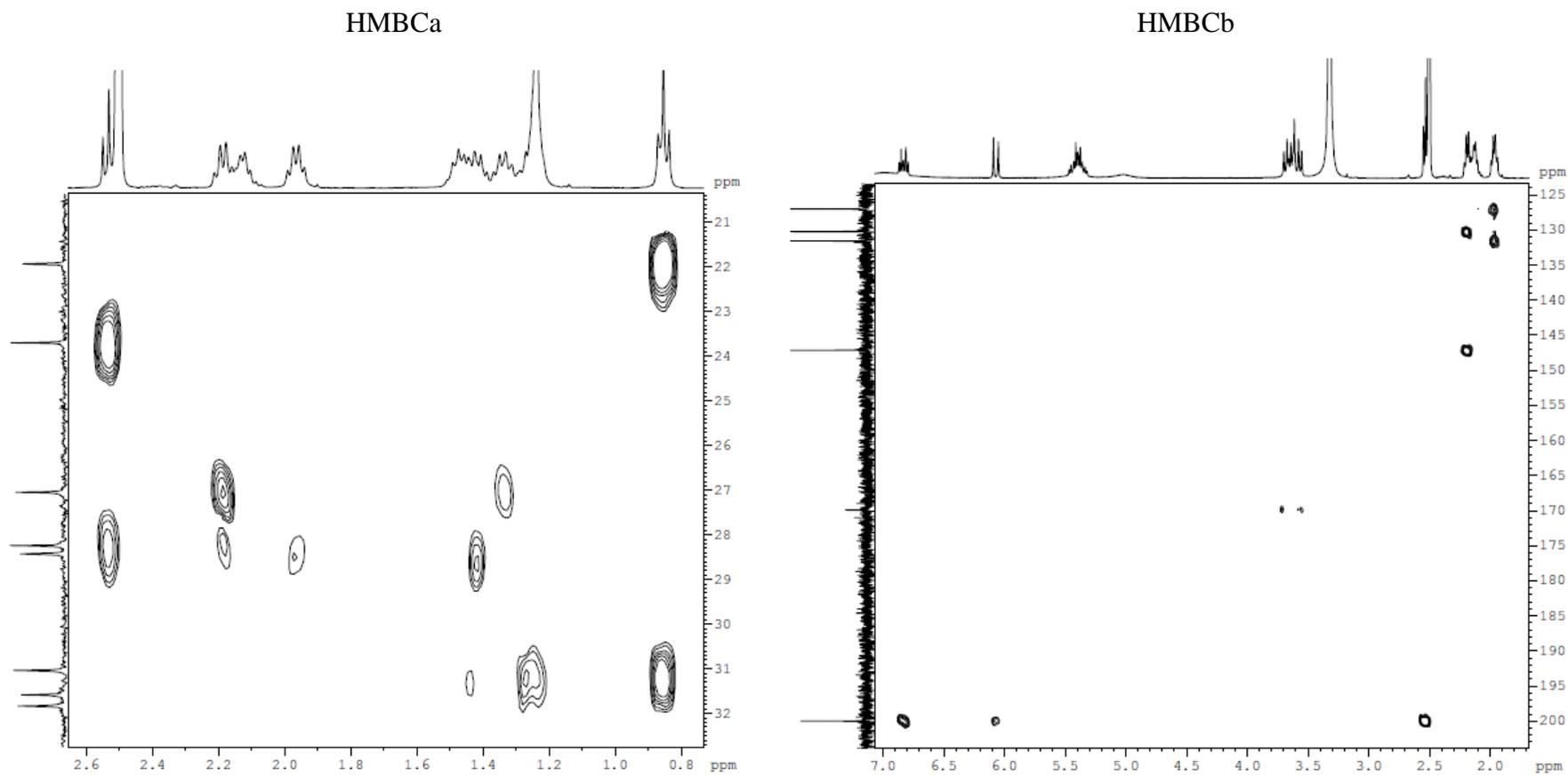


Fig. 41 – Ampliação 1 (HMBCa) e 2 (HMBCb) do mapa de contornos HMBC da substância **1** (A001.13.27).

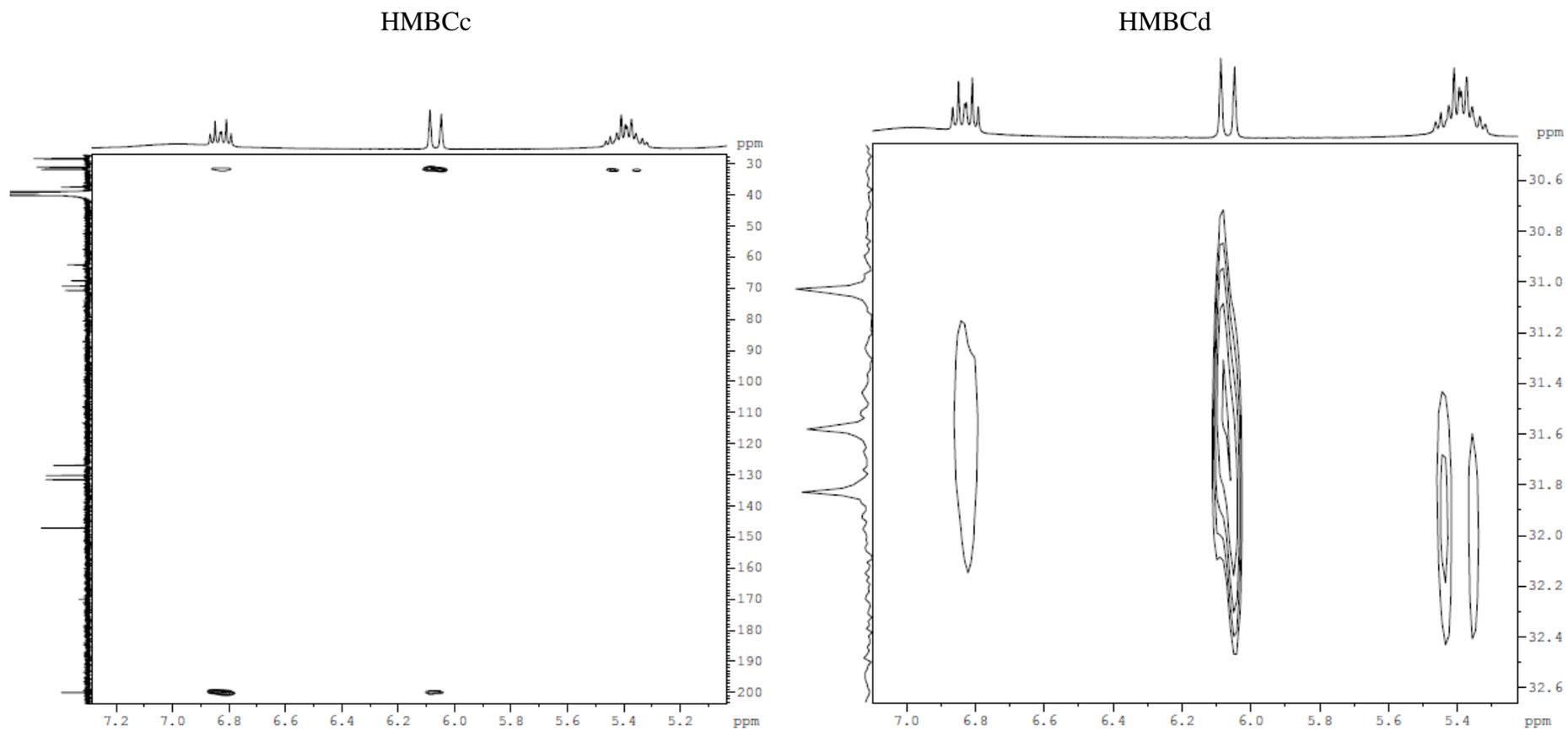
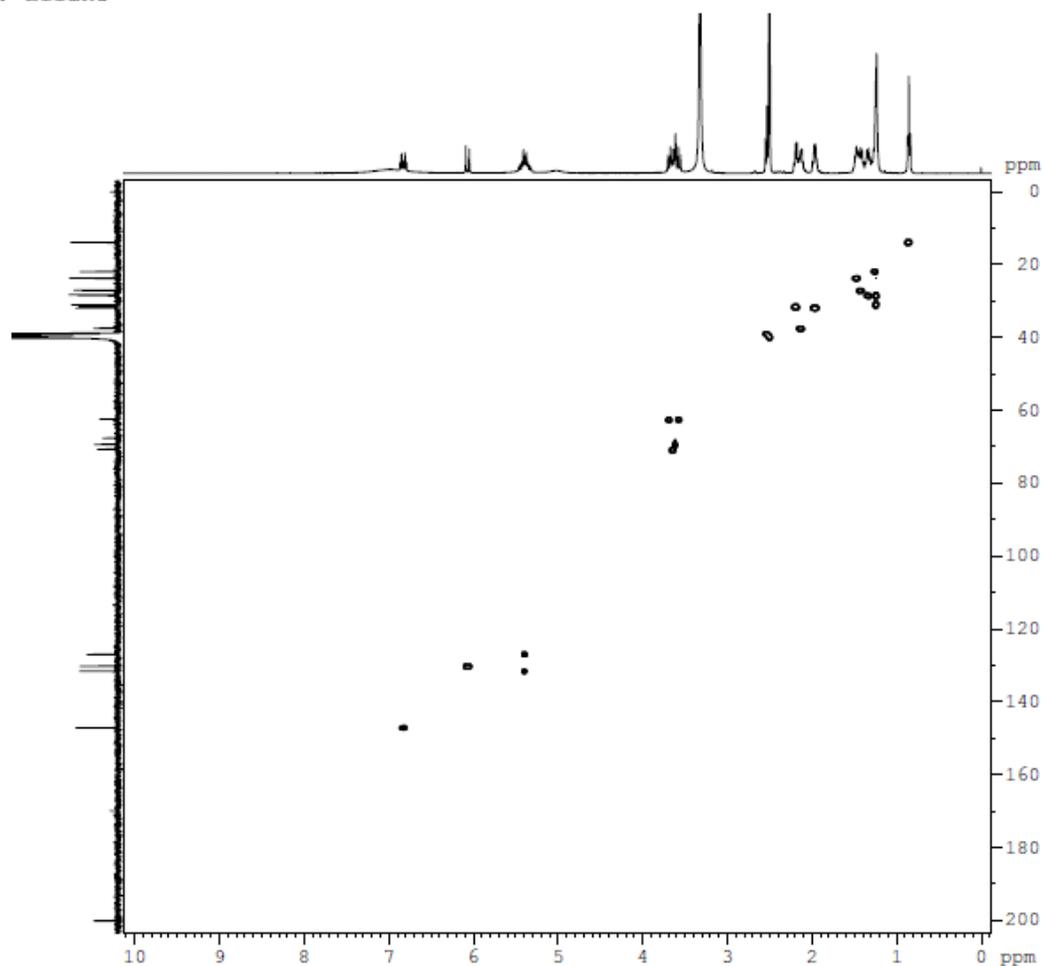


Fig. 42 – Ampliação 3 (HMBCc) e 4 (HMBCd) do mapa de contornos HMBC da substância **1** (A001.13.27).

A 001 13-27 - Cris Bigatti
Op. Eliane



```
Current Data Parameters
NAME      cpqrr03130168
EXPNO     15
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20130306
Time      0.44
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm QNP 1H/13
PULPROG   hsqcetgp
TD         2048
SOLVENT   DMSO
NS         32
DS         32
SWH        8012.820 Hz
FIDRES     3.912510 Hz
AQ         0.1278452 sec
RG         14596.5
DW         62.400 usec
DE         10.00 usec
TE         298.0 K
CNST2     145.0000000
d0         0.00000300 sec
d1         1.50000000 sec
d4         0.00172414 sec
d11        0.03000000 sec
d13        0.00000400 sec
d16        0.00010000 sec
DELTA      0.00113100 sec
DELTA1     0.00071614 sec
IN0        0.00002090 sec
ST1CNT     128
ZGPTNS

===== CHANNEL f1 =====
NUC1       1H
P1         12.50 usec
P2         25.00 usec
P2B        100.00 usec
PL1        -3.00 dB
SFO1       400.1528010 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2    garp
NUC2       13C
P3         7.80 usec
P4         15.60 usec
PCPD2      70.00 usec
PL2        -4.20 dB
PL12       14.50 dB
SFO2       100.6277592 MHz

===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM1     SINK.100
GPNAM2     SINK.100
GPZ1       80.00 %
```

Fig. 43 – Espectro de HSQC da substância 1 (A001.13.27).

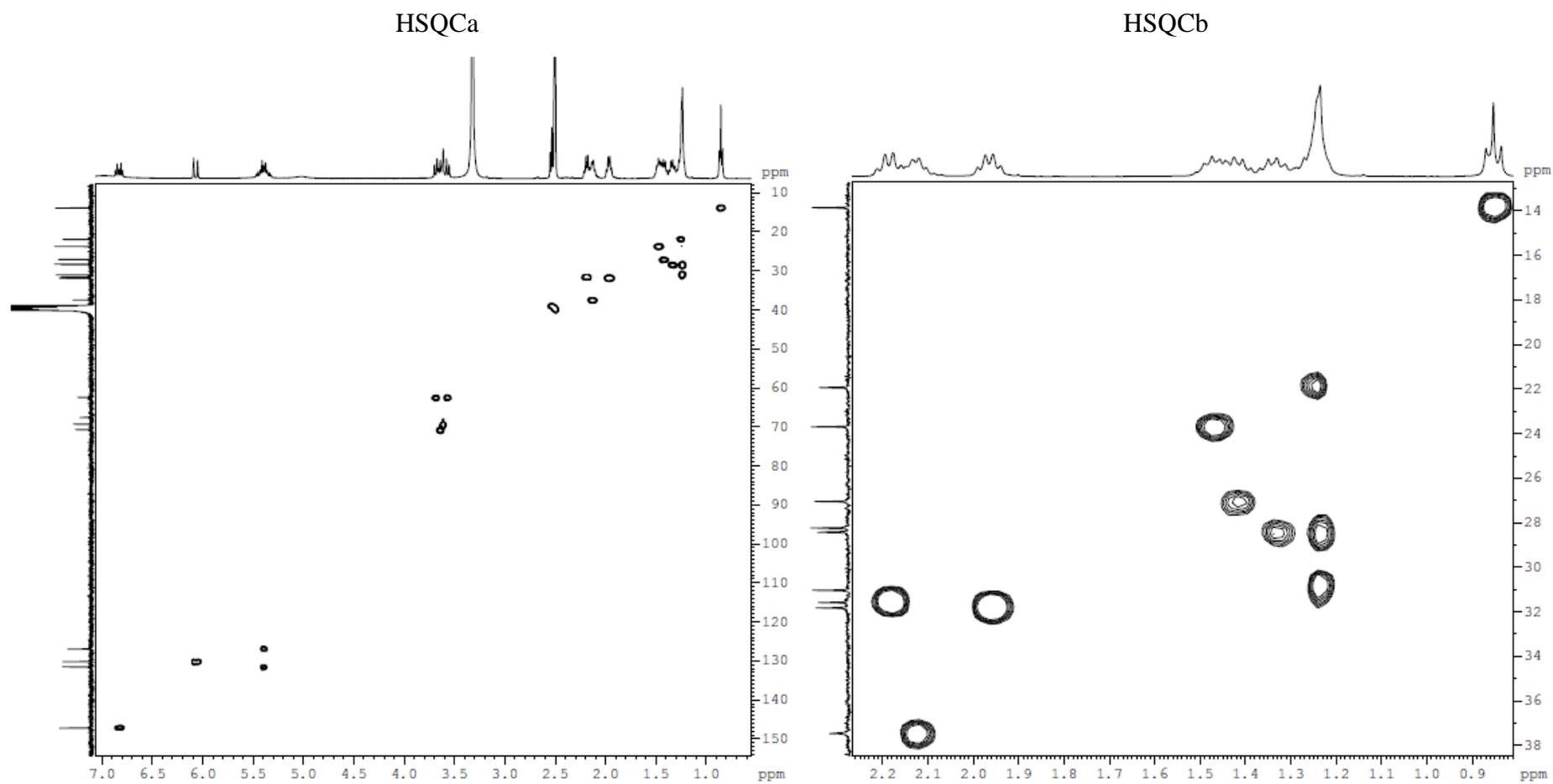


Fig. 44 – Ampliação 1 (HSQCa) e 2 (HSQCb) do mapa de contornos HSQC da substância **1** (A001.13.27).

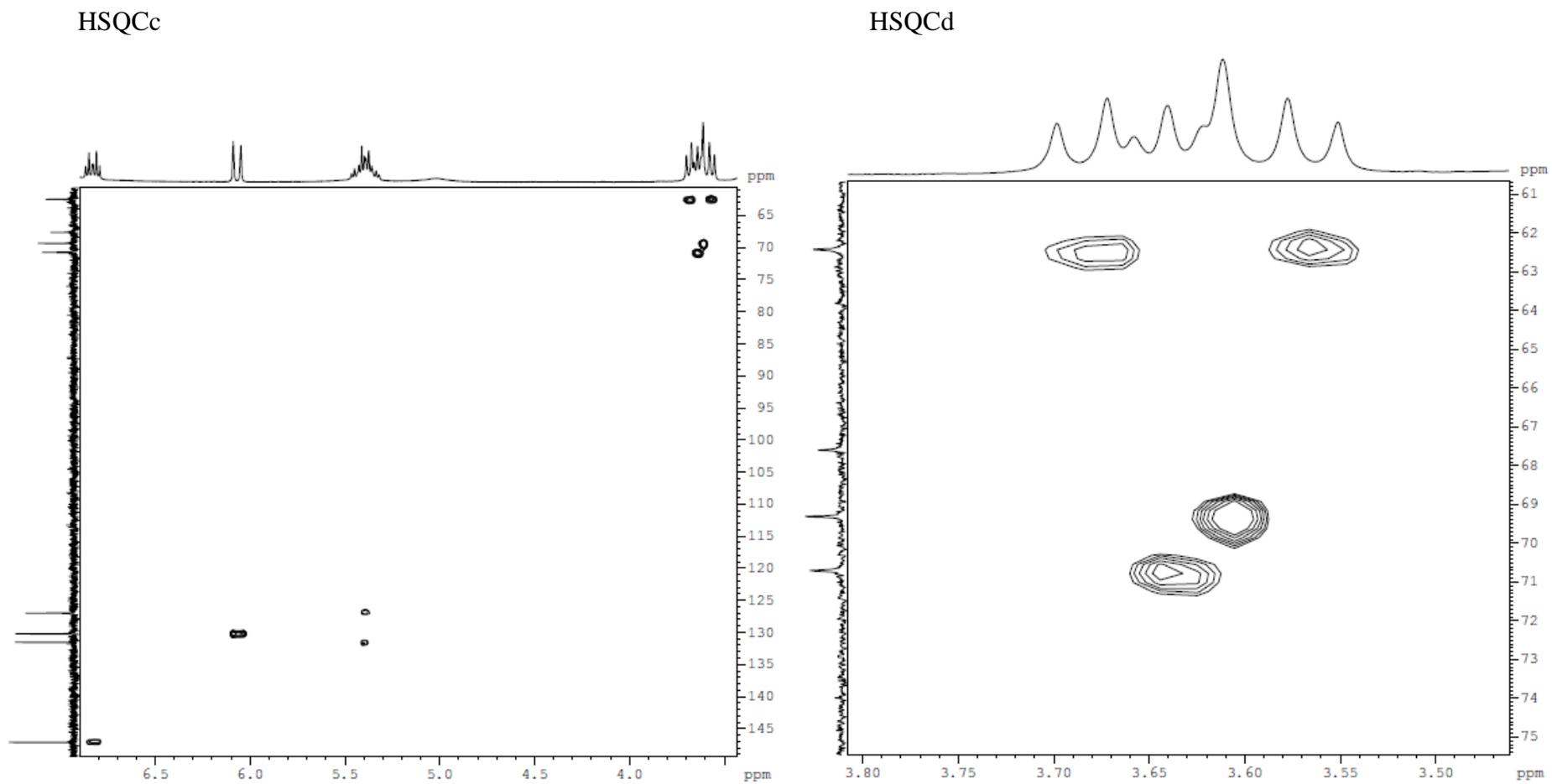
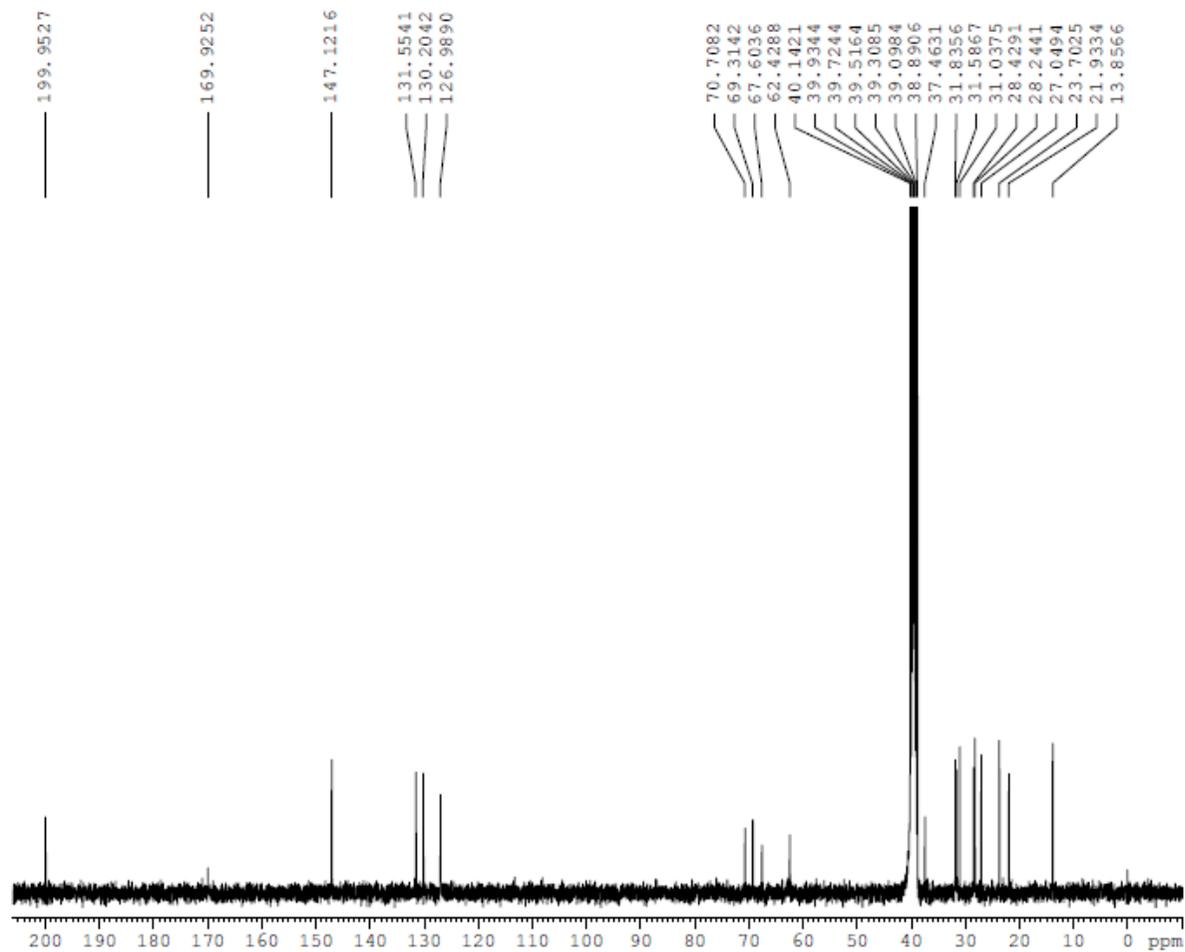


Fig. 45 – Ampliação 2 (HSQCb) e 4 (HSQCd) do mapa de contornos HSQC da substância **1** (A001.13.27).

A 001 13-27 - Cris Bigatti
Op. Eliane



Current Data Parameters
NAME cpqrr03130168
EXPNO 11
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20130305
Time 19.30
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT DMSO
NS 20100
DS 0
SWH 23980.814 Hz
FIDRES 0.731836 Hz
AQ 0.6832628 sec
RG 16384
DW 20.850 usec
DE 6.00 usec
TE 298.0 K
D1 0.50000000 sec
d11 0.03000000 sec
DELTA 0.40000001 sec
TD0 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 7.80 usec
PL1 -4.00 dB
SFO1 100.6278593 MHz

==== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 -3.00 dB
PL12 13.48 dB
PL13 15.00 dB
SFO2 400.1516006 MHz

F2 - Processing parameters
SI 16384
SF 100.6178486 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

Fig. 46 – Espectro de RMN de ^{13}C e da substância **1** - A001.13.27 (100 MHz, DMSO, δ).

A 001 13-27 - Cris Bigatti
Op. Eliane

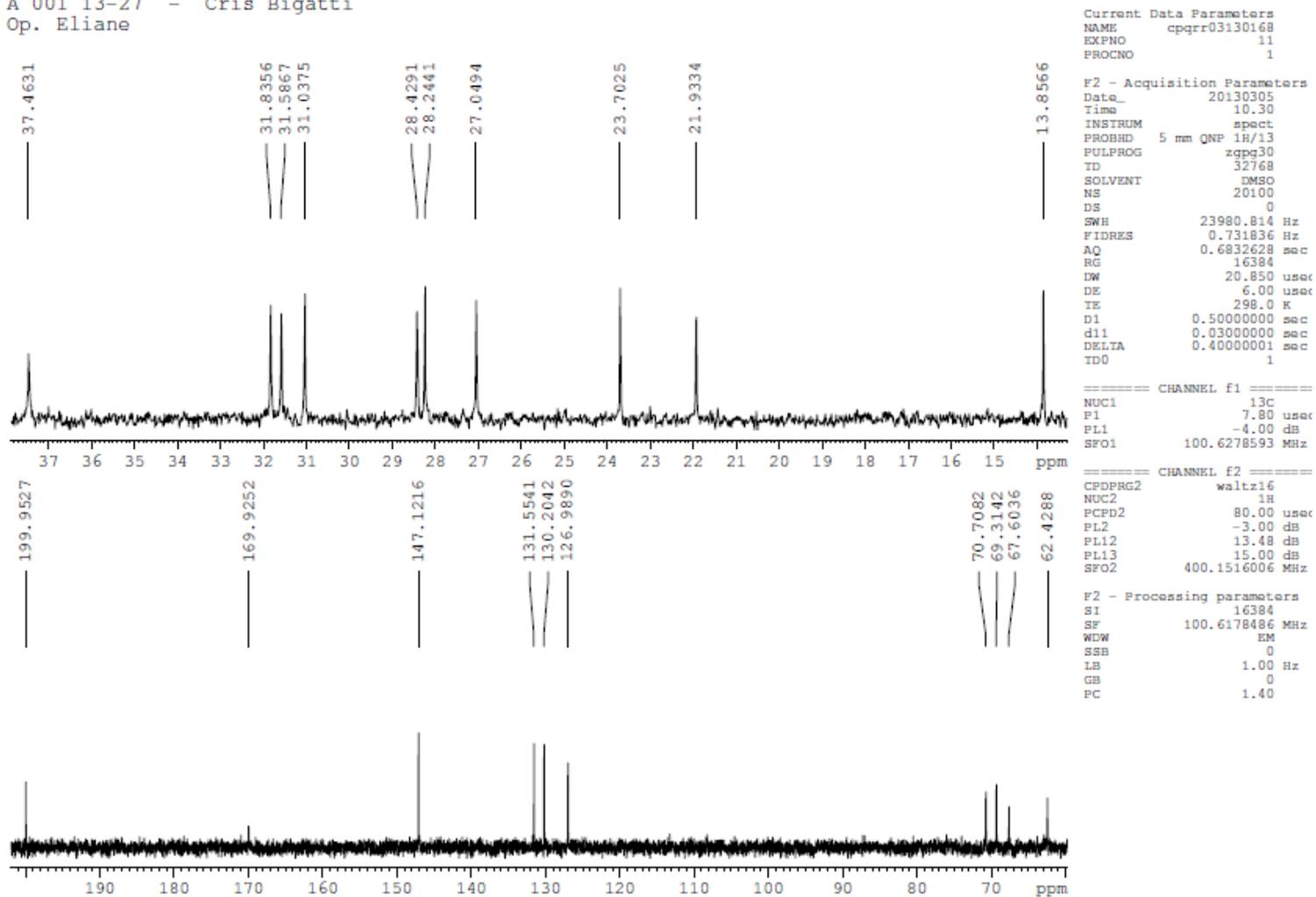
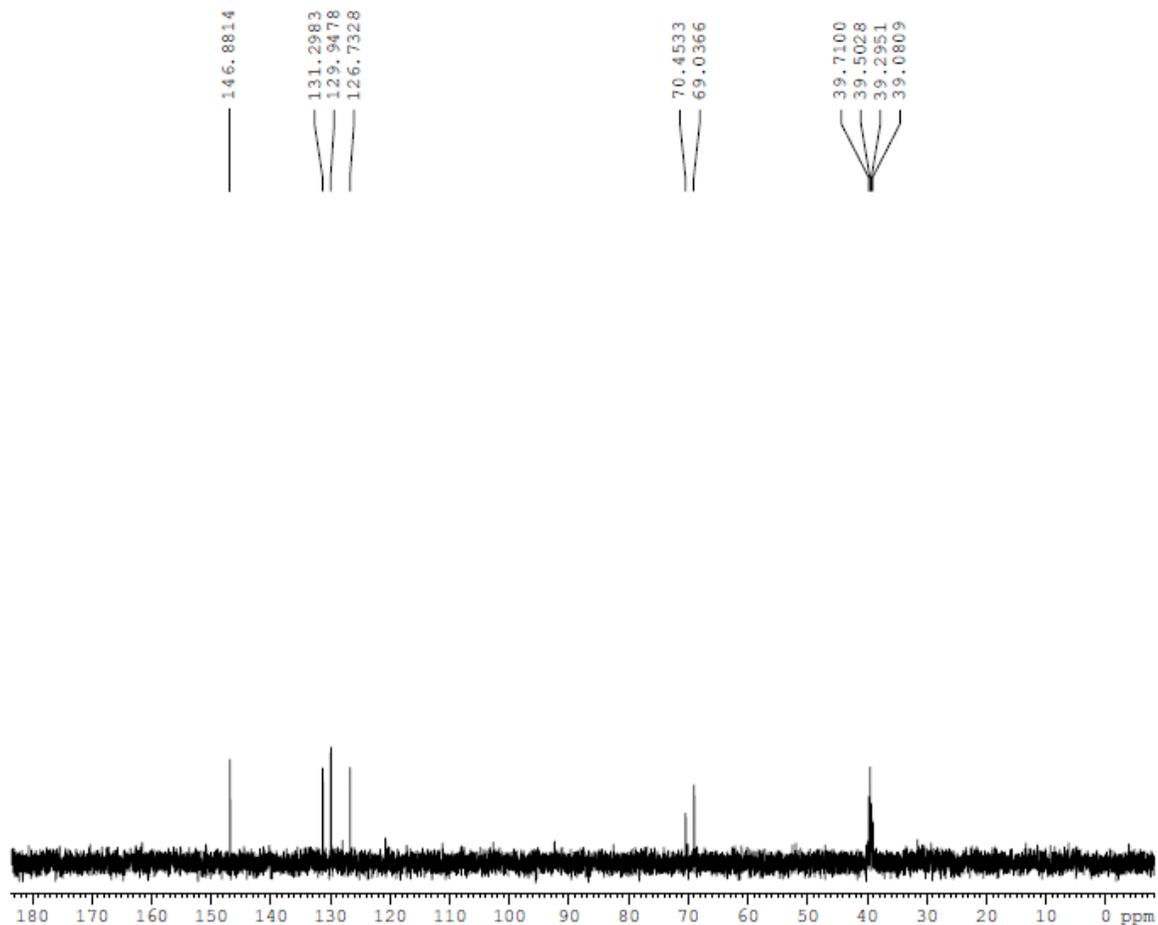


Fig. 47 – Ampliação 1 do espectro de RMN de ^{13}C da substância **1** - A001.13.27 (100 MHz, DMSO, δ).

A 001 13-27 - Cris Bigatti
Op. Eliane



Current Data Parameters
NAME cpqrr03130168
EXPNO 12
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20130305
Time 16.38
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG dept90
TD 65536
SOLVENT DMSO
NS 2048
DS 4
SWH 24154.590 Hz
FIDRES 0.368570 Hz
AQ 1.3566452 sec
RG 16384
DW 20.700 usec
DE 10.00 usec
TE 298.0 K
CNST2 145.0000000
D1 2.00000000 sec
d2 0.00344828 sec
d12 0.00002000 sec
DELTA 0.00000993 sec
TDO 1

==== CHANNEL f1 ====
NUC1 13C
P1 7.80 usec
p2 15.60 usec
PL1 -4.00 dB
SFO1 100.6278598 MHz

==== CHANNEL f2 ====
CFDPRG2 waltz16
NUC2 1H
P3 12.00 usec
p4 24.00 usec
PCPD2 80.00 usec
PL2 -3.00 dB
PL12 13.48 dB
SFO2 400.1516006 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 100.6178747 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

Fig. 48 – Espectro de RMN de ^{13}C (Dept-90) da substância **1** - A001.13.27 (100 MHz, DMSO, δ).

A 001 13-27 - Cris Bigatti
Op. Eliane

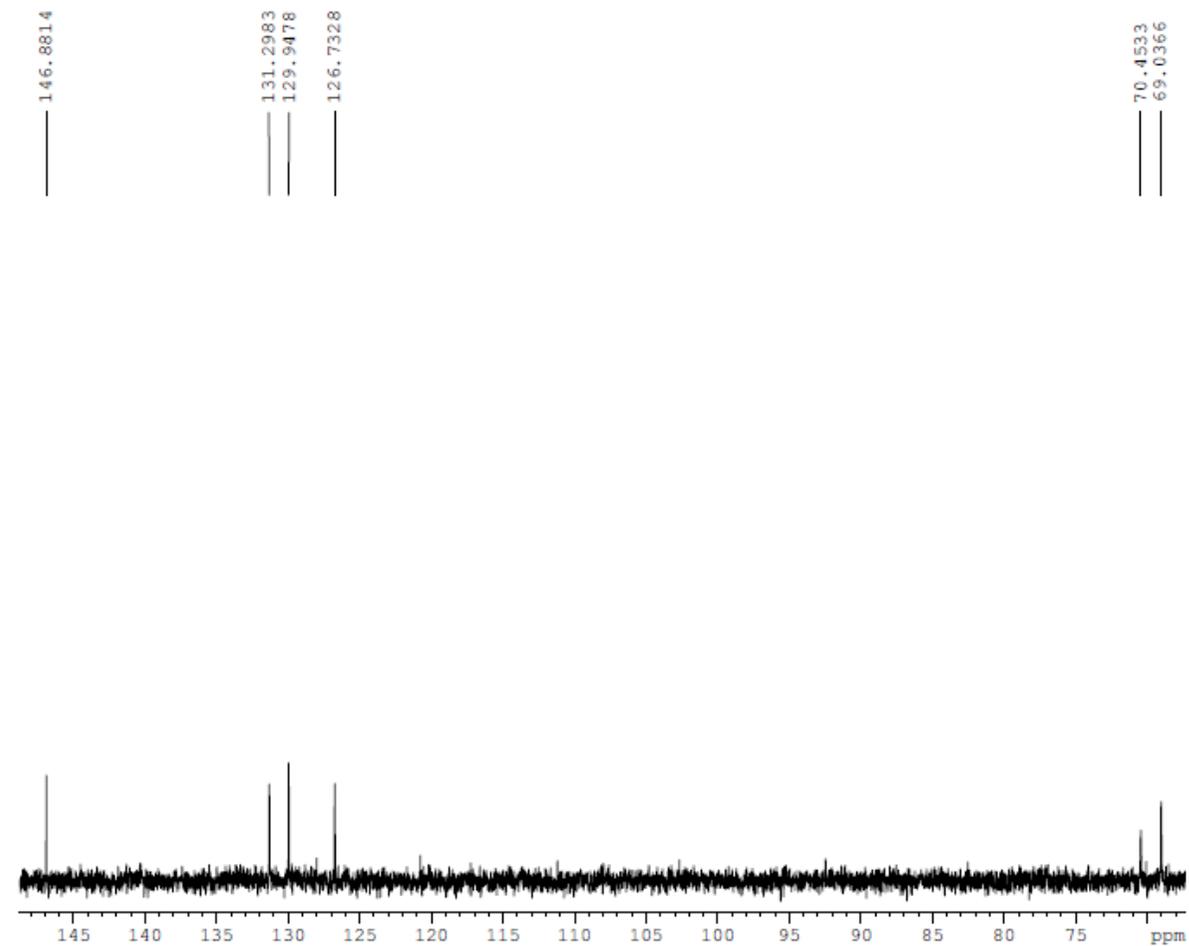
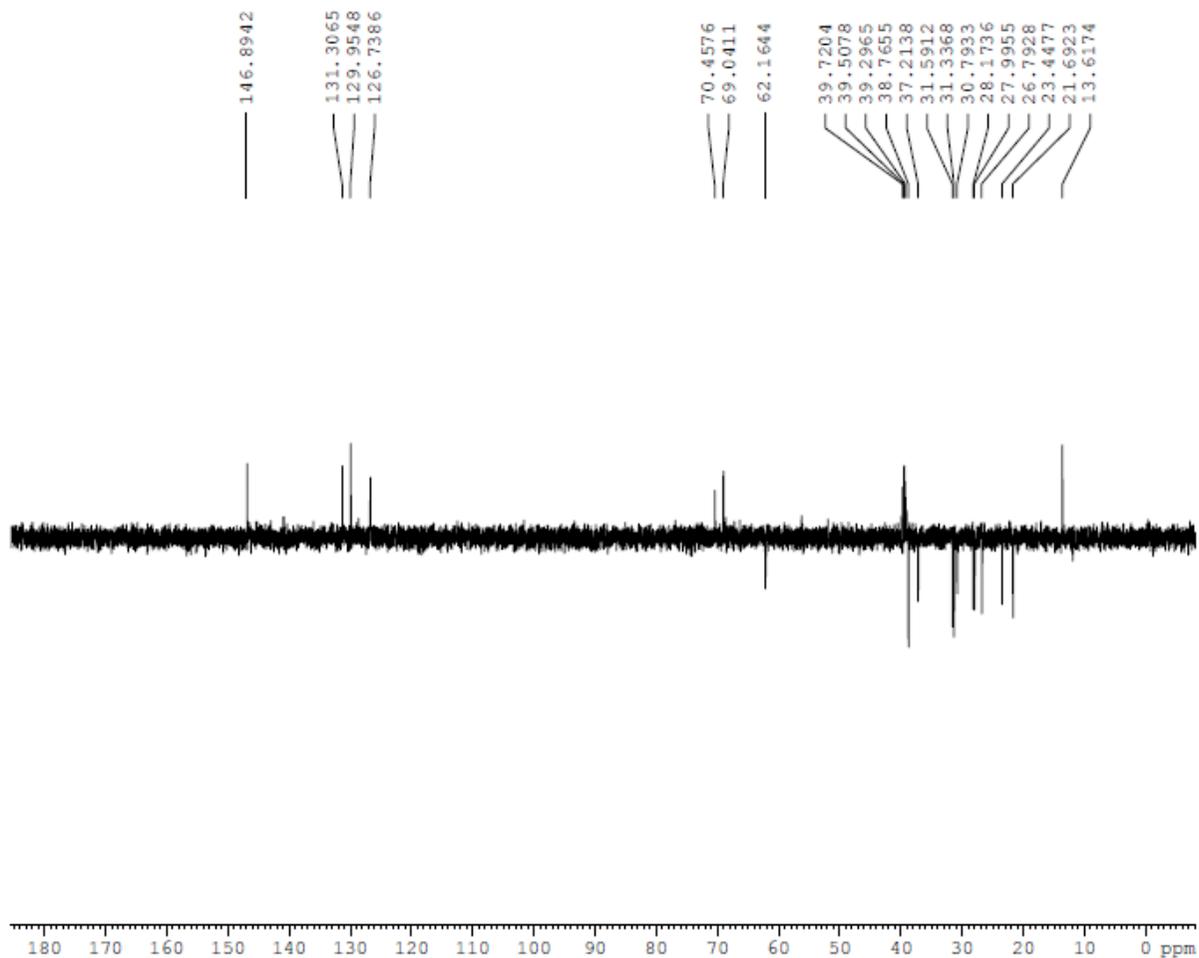


Fig. 49 – Ampliação 1 do espectro de RMN de ^{13}C (Dept-90) da substância **1** - A001.13.27 (100 MHz, DMSO, δ).

A 001 13-27 - Cris Bigatti
Op. Eliane



```
Current Data Parameters
NAME      cpqrr03130168
EXPNO     13
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20130305
Time      20.29
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm QNP 1H/13
PULPROG   dept135
TD         65536
SOLVENT   DMSO
NS         2048
DS         4
SWH        24154.590 Hz
FIDRES     0.368570 Hz
AQ         1.3566452 sec
RG         6502
DW         20.700 usec
DE         10.00 usec
TE         298.0 K
CNST2     145.0000000
D1         2.00000000 sec
d2         0.00344828 sec
d12        0.00002000 sec
DELTA     0.00000993 sec
TD0        1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1       13C
P1         7.80 usec
P2         15.60 usec
PL1        -4.00 dB
SFO1       100.6278598 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2    waltz16
NUC2       1H
P3         12.00 usec
P4         24.00 usec
PCPD2      80.00 usec
PL2        -3.00 dB
PL12       13.48 dB
SFO2       400.1516006 MHz

F2 - Processing parameters
SI         32768
SF         100.6178737 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         1.00 Hz
GB         0
PC         1.40
```

Fig. 50 – Espectro de RMN de ^{13}C (Dept-135) da substância 1 - A001.13.27 (100 MHz, DMSO, δ).

A 001 13-27 - Cris Bigatti
Op. Eliane

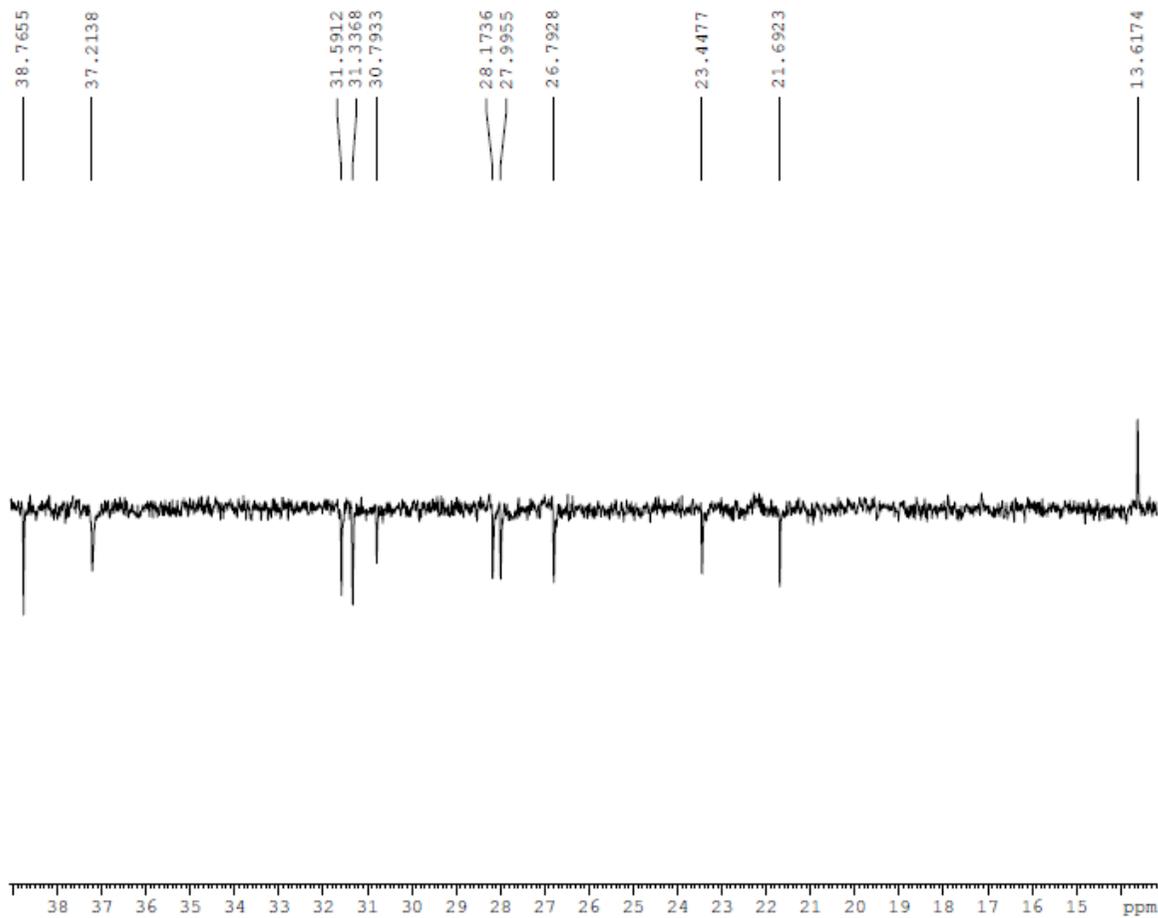


Fig. 51 – Ampliação 1 do espectro de RMN de ^{13}C (Dept-135) da substância **1** - A001.13.27 (100 MHz, DMSO, δ).

A 001 13-27 - Cris Bigatti
Op. Eliane

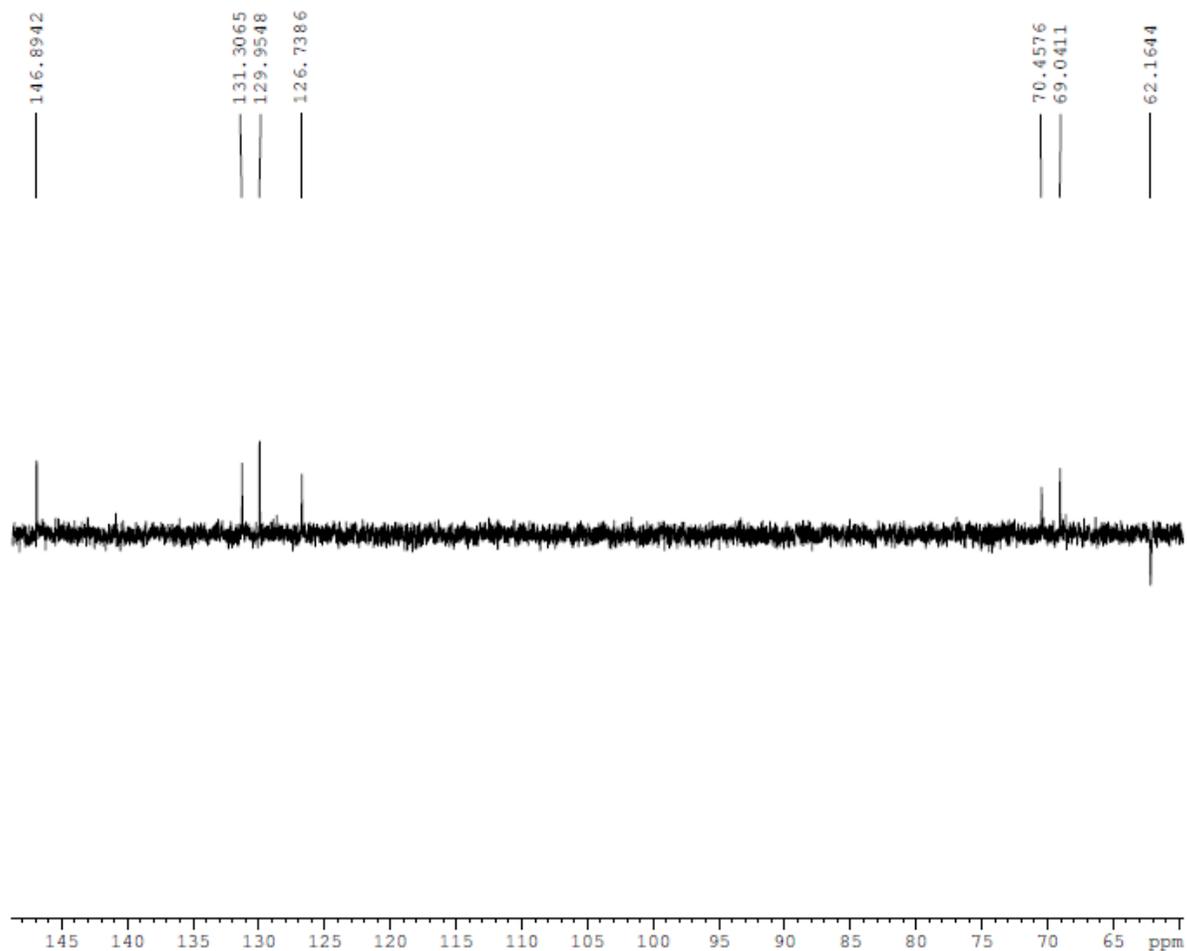


Fig. 52 – Ampliação 2 do espectro de RMN de ^{13}C (Dept-135) da substância **1** - A001.13.27 (100 MHz, DMSO, δ).

ANEXO F

Espectros de U.V., massas, perfil de fragmentação e RMN da substância **2**

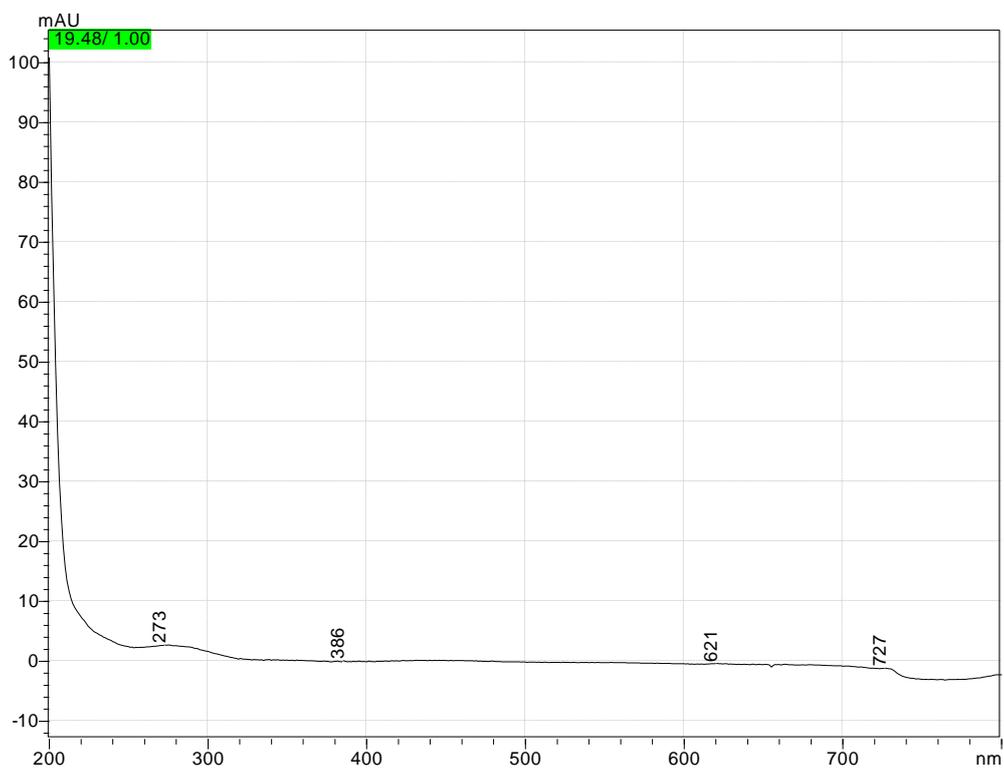


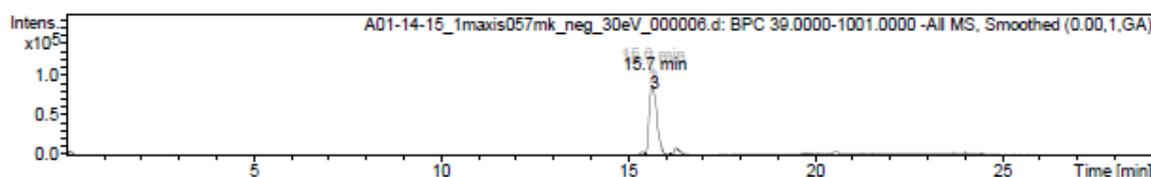
Fig. 53 – Espectro no U.V. da substância **2** (200-800 nm).



General Unknown Formula Report

Analysis Info

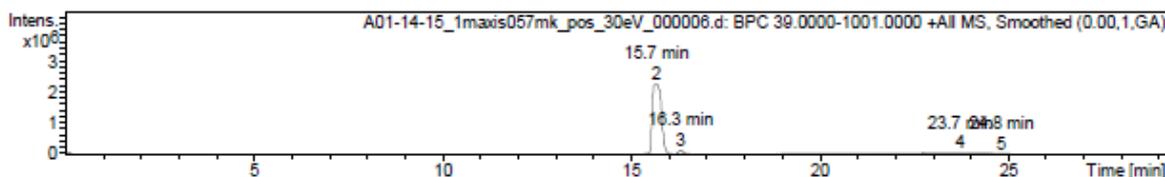
Analysis Name D:\Data\CPqRR\LQPN\Christiane\A01-14-15\A01-14-15_1maxis057mk_neg_30eV_000006.d Acquisition Date 1/31/2013 4:48:54 PM
 Method mk_HPLC_200ulmin_40-1000_autoMSMS_neg_30eV.m Operator BDAL@DE
 Sample Name LC-MS/MS Instrument / Ser# maXis ETD 10201
 Comment Client: CPqRR/LQPN/Christiane
 Sample type: Natural Products
 LC-gradient: 1-100% ACN in 12.5min
 Vial content solved in 800ul MeOH
 injection: 10ul



Formulas of Impurities

#	Compound	m/z.meas.	m/z.calc.	Error [ppm]	Error [mDa]	mSigma	Formula
1	Cmpd 1, 938.4 s	400.270570	400.2691	-3.6	-1.5	2.5	C 18 H 30 N 11
		400.2705	400.2705	-0.3	-0.1	6.5	C 21 H 38 N 1 O 6
		801.548750	801.5495	1.0	0.8	2.7	C 43 H 73 N 6 O 8
			801.5482	-0.7	-0.6	8.5	C 42 H 77 N 2 O 12
			801.5482	-0.7	-0.6	9.2	C 40 H 65 N 16 O 2
			801.5489	-2.4	-1.9	12.9	C 39 H 69 N 12 O 6
			801.5509	2.7	2.1	14.7	C 44 H 69 N 10 O 4
			801.5522	4.3	3.5	16.5	C 47 H 77 O 10
			801.5455	-4.1	-3.2	18.0	C 38 H 61 N 22

Note: mSigma fits < 50 indicates high probability of correct formula



Formulas of Impurities

#	Compound	m/z.meas.	m/z.calc.	Error [ppm]	Error [mDa]	mSigma	Formula
1	Cmpd 1, 6.0 s	158.964264	158.9649	3.7	0.6	12.7	C 1 N 2 Na 1 O 6
2	Cmpd 2, 939.2 s	402.286379	402.2850	-3.4	-1.4	8.2	C 21 H 40 N 1 O 6
3	Cmpd 3, 977.7 s	415.288942	414.2885	2.4	1.0	18.3	C 11 H 33 N 15 Na 1 O 1
4	Cmpd 4, 1421.8 s	172.094775	172.0941	-3.7	-0.6	9.5	C 4 H 10 N 7 O 1
		338.342263	338.3417	-1.5	-0.5	18.3	C 22 H 44 N 1 O 1

Note: mSigma fits < 50 indicates high probability of correct formula

Fig. 54 – Espectro de Massas da substância 2 (A01.14.15): mK_neg_30eV e mK_pos_30eV.



Ministério da Saúde
 Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de Pesquisas René Rachou
 Av. Augusto de Lima, 1715 – Bairro Barro Preto
 39100-002 Belo Horizonte – MG – BRASIL
 Tel.: (31) 3349-7700 – FAX: (31) 3295-3115



Accurate Mass Report

Sample Name **A001-14-15** Acquisition Date: 5/17/2013 9:21:12 AM
 Comment Client: CPqRR/LQPN/Cristiane Instrument: maXis ETD
 Sample type: natural product
 Purity: single HPLC peak

sample (0.2-1mg/ml) diluted 1:10 in 50% MeOH, 0.1% HFO

Method mk_direkt-infusion_small-compounds_75-1000_neg.m
 Data Path D:\Data\Acquisition_neg\A001-14-15\A001-14-15_1maxis073mk_neg_MS2(400-30eV).d

Acquisition Parameter

Ion Polarity	Negative	Scan Mode	MS/MS (MRM)	Used Reference MassList	Na Formate (neg)
Scan Begin	75 m/z	isCID Energy	0.0 eV	TOF Calibration Mode Version	Version 1
Scan End	1000 m/z	Collision Energy	-30.0 eV	TOF1 Calibration Mode	Quadratic + HPC
Source Type	ESI	Set Ion Cooler RF	25.0 Vpp	TOF1 Calibration Standard	0.3
Set End Plate Offset	-500 V	Set Ion Cooler Transfer	49.0 µs	Deviation in PPM	
Set Capillary	4500 V	Time		TOF2 Calibration Mode	-1
Nebulizer	0.4 Bar	Set Ion Cooler Pre Pulse	7.0 µs	TOF2 Calibration Standard	0.1
Dry Gas	4.0 l/min	Storage Time		Deviation in PPM	
Dry Heater	180 °C				
Set Divert Valve	Waste	Rolling Averages	3 Off		

Results

Meas. m/z	#	Formula	Score	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	mSigma	rdb	e ⁻ Conf	N-Rule
104.0356	1	C 3 H 6 N O 3	100.00	104.0353	-2.8	-2.8	5.0	1.5	even	ok
295.2281	1	C 18 H 31 O 3	100.00	295.2279	-0.7	-0.9	18.3	3.5	even	ok
334.2389	1	C 20 H 32 N O 3	100.00	334.2388	-0.4	-0.3	21.1	5.5	even	ok
400.2707	1	C 18 H 30 N 11	54.92	400.2691	-3.9	-3.4	17.9	9.5	even	ok
	2	C 22 H 34 N 5 O 2	66.70	400.2718	2.8	3.3	21.6	8.5	even	ok
	3	C 21 H 38 N O 6	100.00	400.2705	-0.5	0.0	24.5	3.5	even	ok

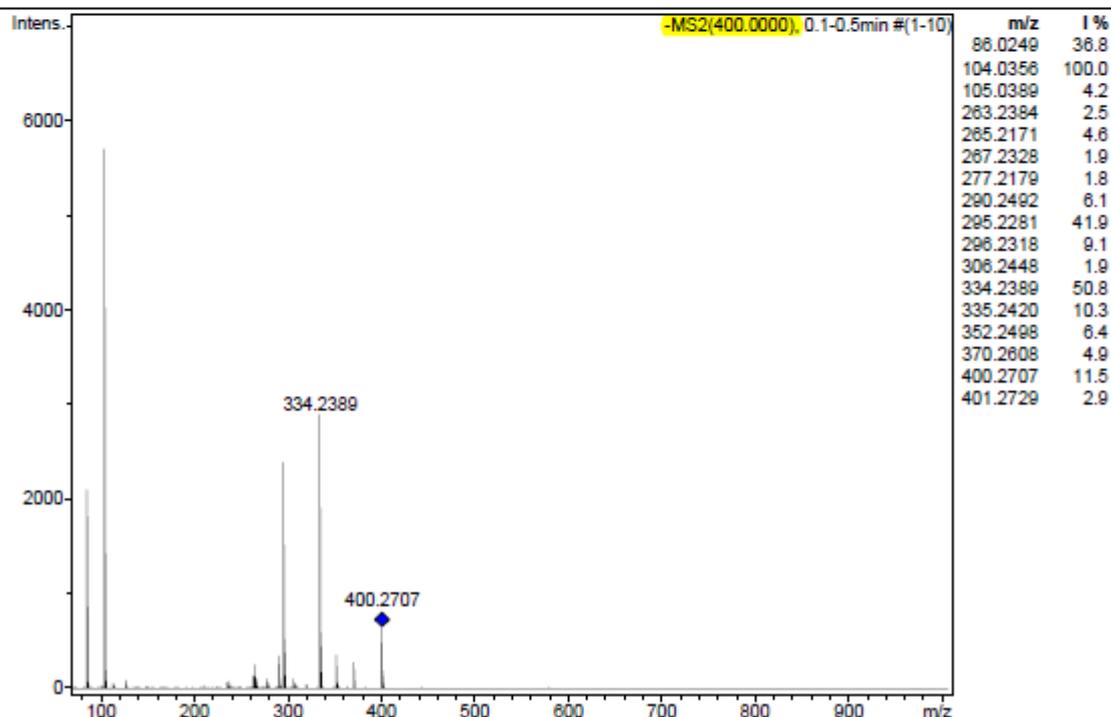


Fig. 55 – Perfil de fragmentação da substância 2 (A01.14.15) – perfil 1.



Ministério da Saúde
 Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de Pesquisas René Rachou
 Av. Augusto de Lima, 1715 – Bairro Barro Preto
 39100-002 Belo Horizonte – MG – BRASIL
 Tel.: (31) 3349-7700 – FAX: (31) 3295-3115



Accurate Mass Report

Sample Name **A001-14-15** Acquisition Date: 5/17/2013 4:09:24 PM
 Comment Client: CPqRR/LQPN/Cristiane Instrument maXis ETD
 Sample type: natural product
 Purity: single HPLC peak
 sample (0.2-1mg/ml) diluted 1:10 in 50% MeOH, 0.1% HFO

Method mk_direkt-infusion_small-compounds_75-1000_pos.m
 Data Path D:\Data\Acquisition_neg\A001-14-15\A001-14-15_1maxis073mk_pos_MS2(402-30eV).d

Acquisition Parameter

Ion Polarity	Positive	Scan Mode	MS/MS (MRM)	Used Reference MassList	Na Formate (pos)
Scan Begin	75 m/z	isCID Energy	0.0 eV	TOF Calibration Mode Version	Version 1
Scan End	1000 m/z	Collision Energy	30.0 eV	TOF1 Calibration Mode	Quadratic + HPC
Source Type	ESI	Set Ion Cooler RF	25.0 Vpp	TOF1 Calibration Standard	0.2
Set End Plate Offset	-500 V	Set Ion Cooler Transfer	45.0 µs	Deviation in PPM	
Set Capillary	4500 V	Time		TOF2 Calibration Mode	Enhanced Quadratic
Nebulizer	0.4 Bar	Set Ion Cooler Pre Pulse	7.0 µs	TOF2 Calibration Standard	0.1
Dry Gas	4.0 l/min	Storage Time		Deviation in PPM	
Dry Heater	180 °C				
Set Divert Valve	Waste	Rolling Averages	3 Off		

Results

Meas. m/z	#	Formula	Score	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	mSigma	rdb	e ⁻ Conf	N-Rule
90.0553	1	C 3 H 8 N O 2	100.00	90.0550	-3.7	-1.8	13.2	0.5	even	ok
104.0347	1	C 3 H 6 N O 3	100.00	104.0342	-4.6	-4.6	4.7	1.5	even	ok
113.0966	1	C 7 H 13 O	100.00	113.0961	-4.7	-4.6	5.4	1.5	even	ok
121.1017	1	C 9 H 13	100.00	121.1012	-4.5	-4.4	10.6	3.5	even	ok
231.2118	1	C 17 H 27	100.00	231.2107	-4.6	-4.6	14.5	4.5	even	ok
290.2493	1	C 19 H 32 N O	100.00	290.2478	-5.0	-4.9	22.8	4.5	even	ok
304.2650	1	C 20 H 34 N O	100.00	304.2635	-4.9	-4.9	21.1	4.5	even	ok
322.2756	1	C 20 H 36 N O 2	100.00	322.2741	-4.8	-4.9	27.0	3.5	even	ok
336.2550	1	C 20 H 34 N O 3	100.00	336.2533	-4.9	-4.9	23.7	4.5	even	ok
384.2765	1	C 22 H 34 N 5 O	100.00	384.2758	-1.9	-2.0	33.0	8.5	even	ok
402.2872	1	C 22 H 36 N 5 O 2	100.00	402.2864	-2.1	-2.1	36.5	7.5	even	ok
402.2872	2	C 25 H 37 N 3 Na	70.90	402.2880	1.9	1.9	49.8	8.5	even	ok

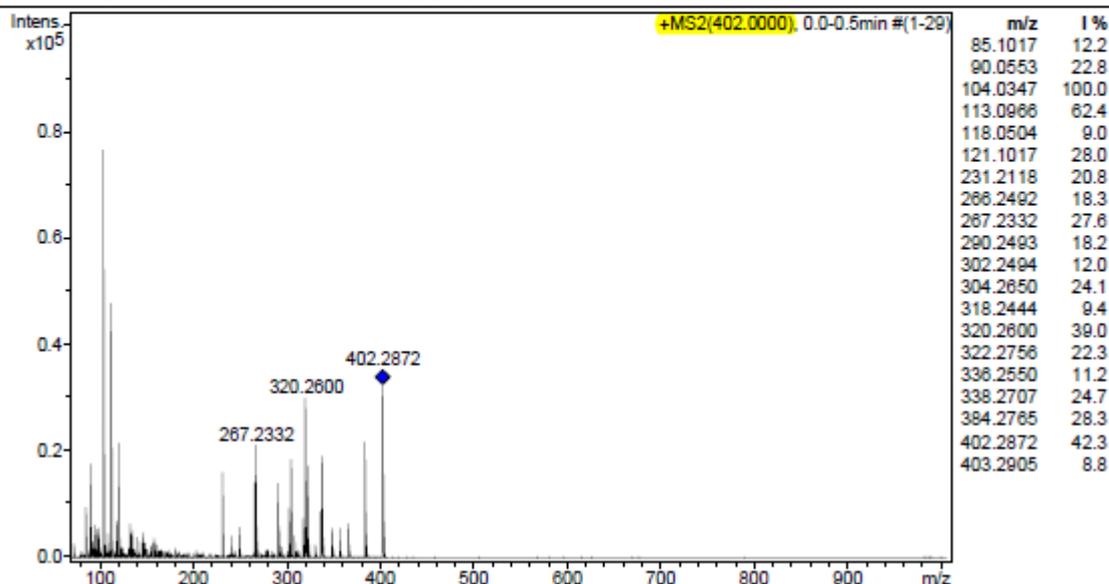


Fig. 56 – Perfil de fragmentação da substância 2 (A01.14.15) – perfil 2.

A 001 14-15 - Cris Bigatti
Op. Eliane

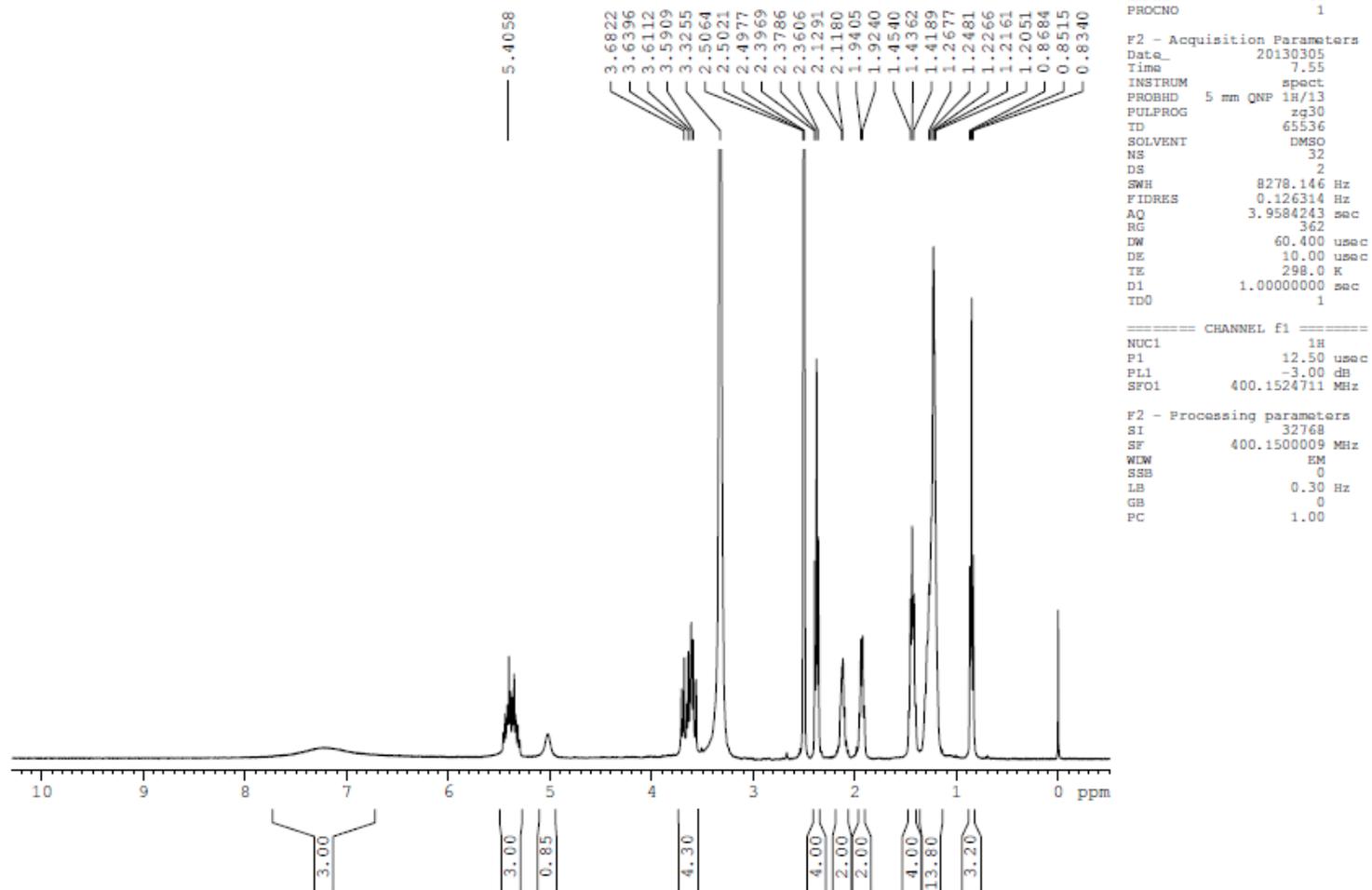


Fig. 57 – Espectro de RMN de ^1H da substância **2** - A001.14.15 (400 MHz, DMSO, δ).

A 001 14-15 - Cris Bigatti
Op. Eliane

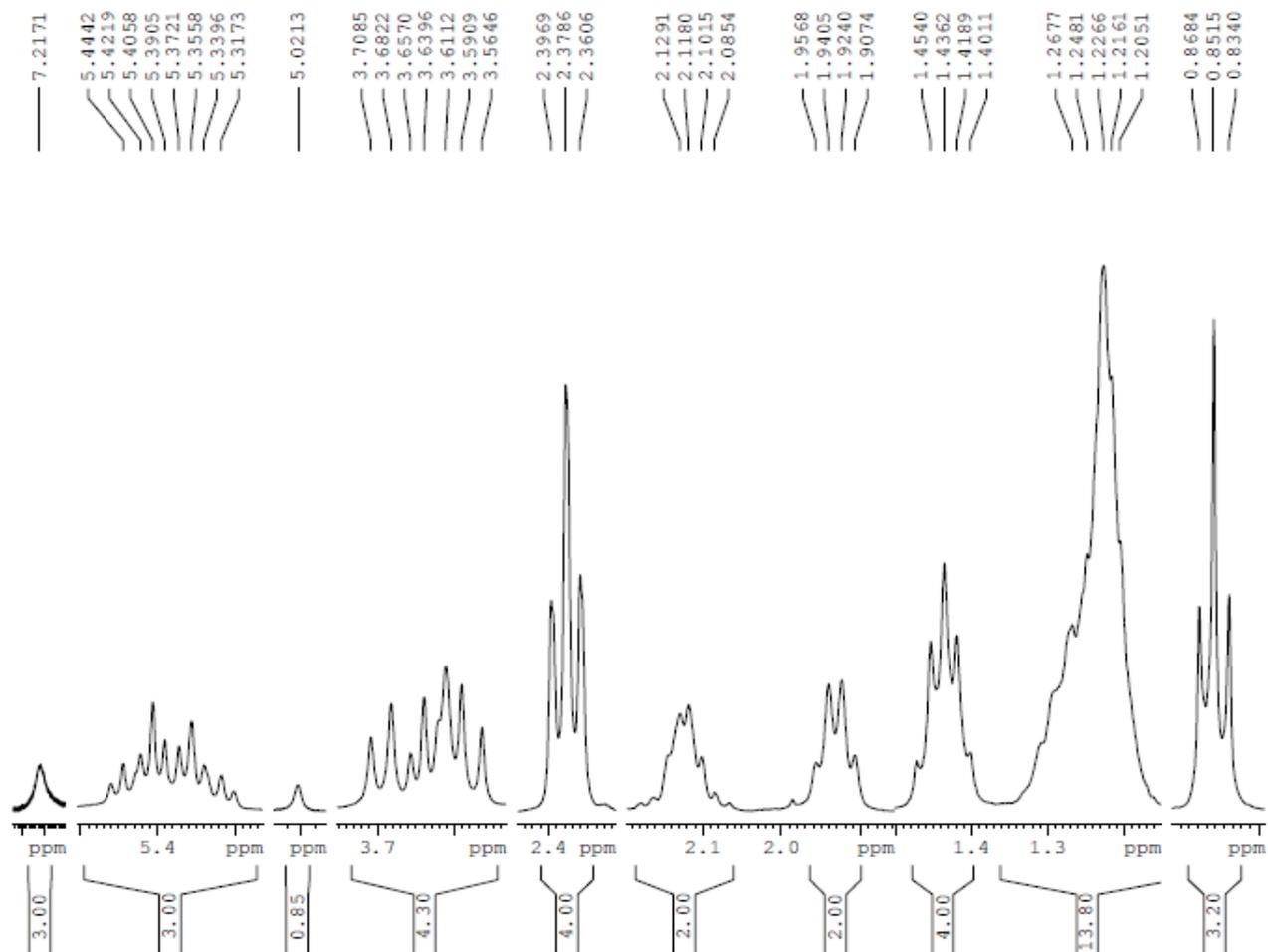
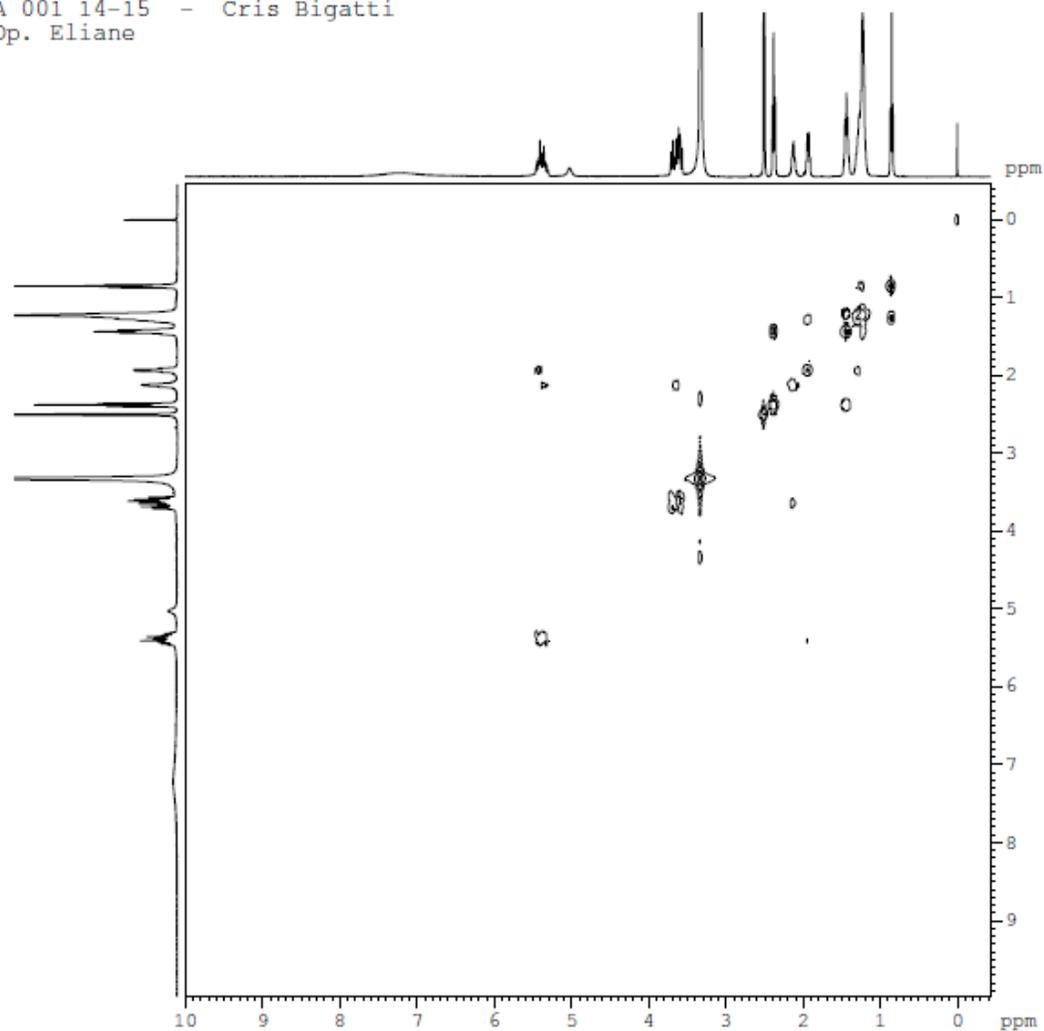


Fig. 58 – Ampliação 1 do espectro de RMN de ^1H da substância **2** - A001.14.15 (400 MHz, DMSO, δ).

A 001 14-15 - Cris Bigatti
Op. Eliane



Current Data Parameters
NAME cpqrr03130163
EXPNO 14
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20130304
Time 20.12
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG cosygpgf
TD 4096
SOLVENT DMSO
NS 32
DS 0
SWH 5995.204 Hz
FIDRES 1.463673 Hz
AQ 0.3416564 sec
RG 406.4
DW 83.400 usec
DE 10.00 usec
TE 298.0 K
d0 0.00000300 sec
D1 1.48689198 sec
d13 0.00000400 sec
D16 0.00010000 sec
IN0 0.00016660 sec

==== CHANNEL f1 ====
NUC1 1H
P0 12.50 usec
P1 12.50 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 400.1528010 MHz

==== GRADIENT CHANNEL ====
GPNAM1 SINE.100
GPZ1 10.00 %
P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
ND0 1
TD 128
SFO1 400.1528 MHz
FIDRES 46.893757 Hz
SW 15.000 ppm
FnmODE QF

F2 - Processing parameters
SI 1024
SF 400.1499971 MHz
WDW SINE
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.40

Fig. 59 – Mapa de contornos COSY da substância **2** - A001.14.15 (400 MHz, DMSO, δ).

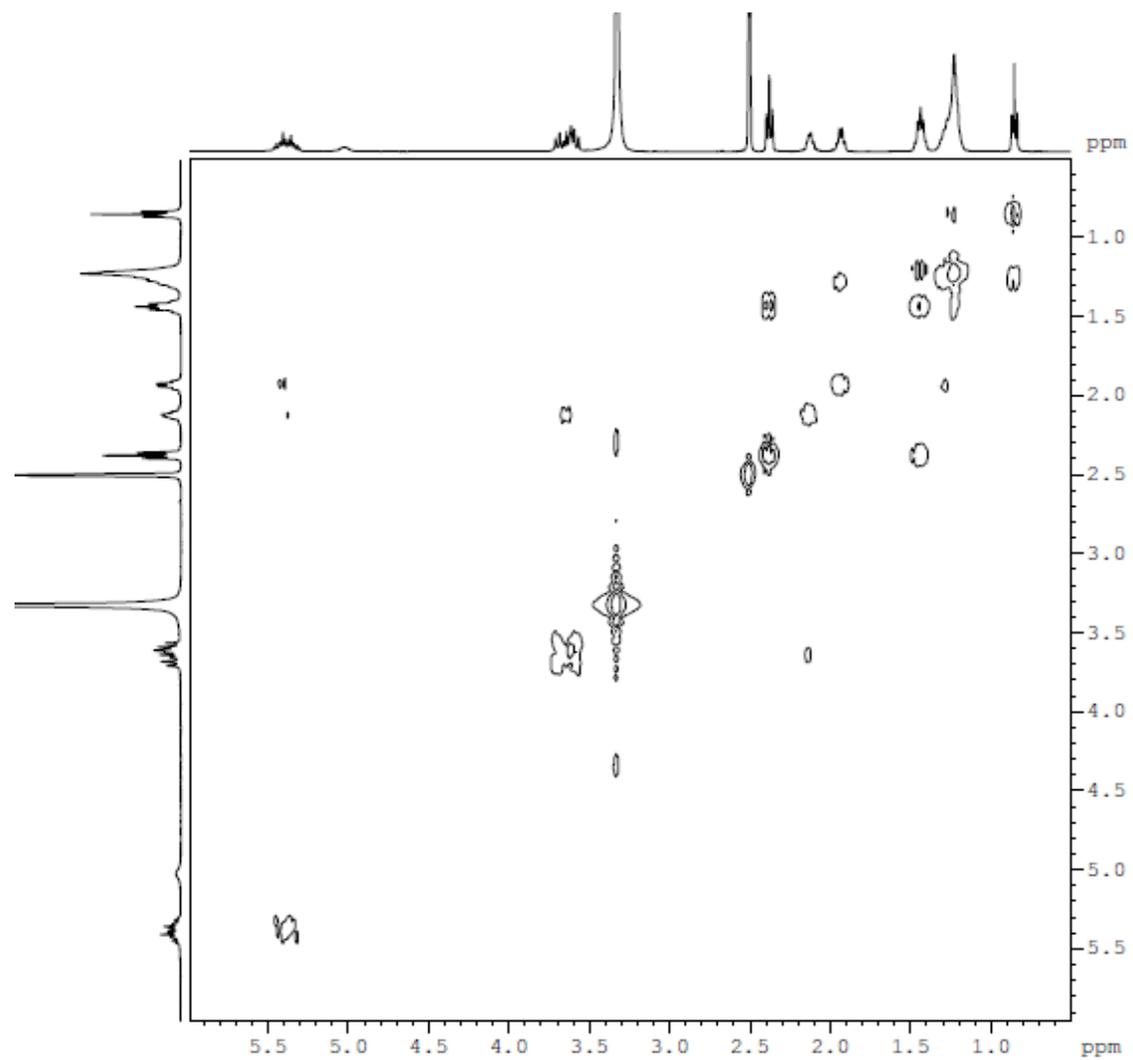


Fig. 60 – Ampliação 1 do mapa de contornos COSY da substância **2** - A001.14.15 (400 MHz, DMSO, δ).

A 001 14-15 - Cris Bigatti
Op. Eliane

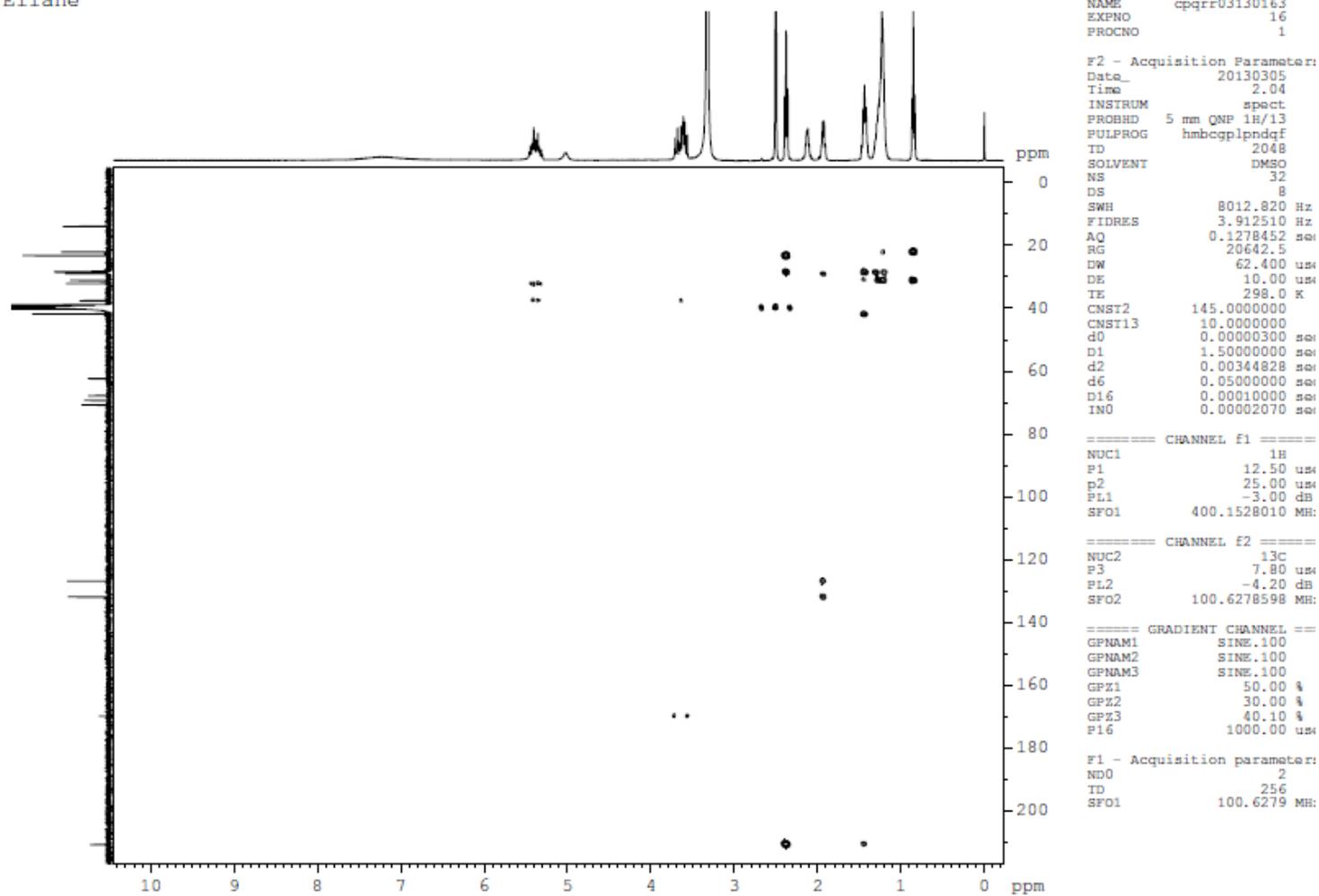


Fig. 61 – Espectro de HMBC da substância 2 (A001.14.15).

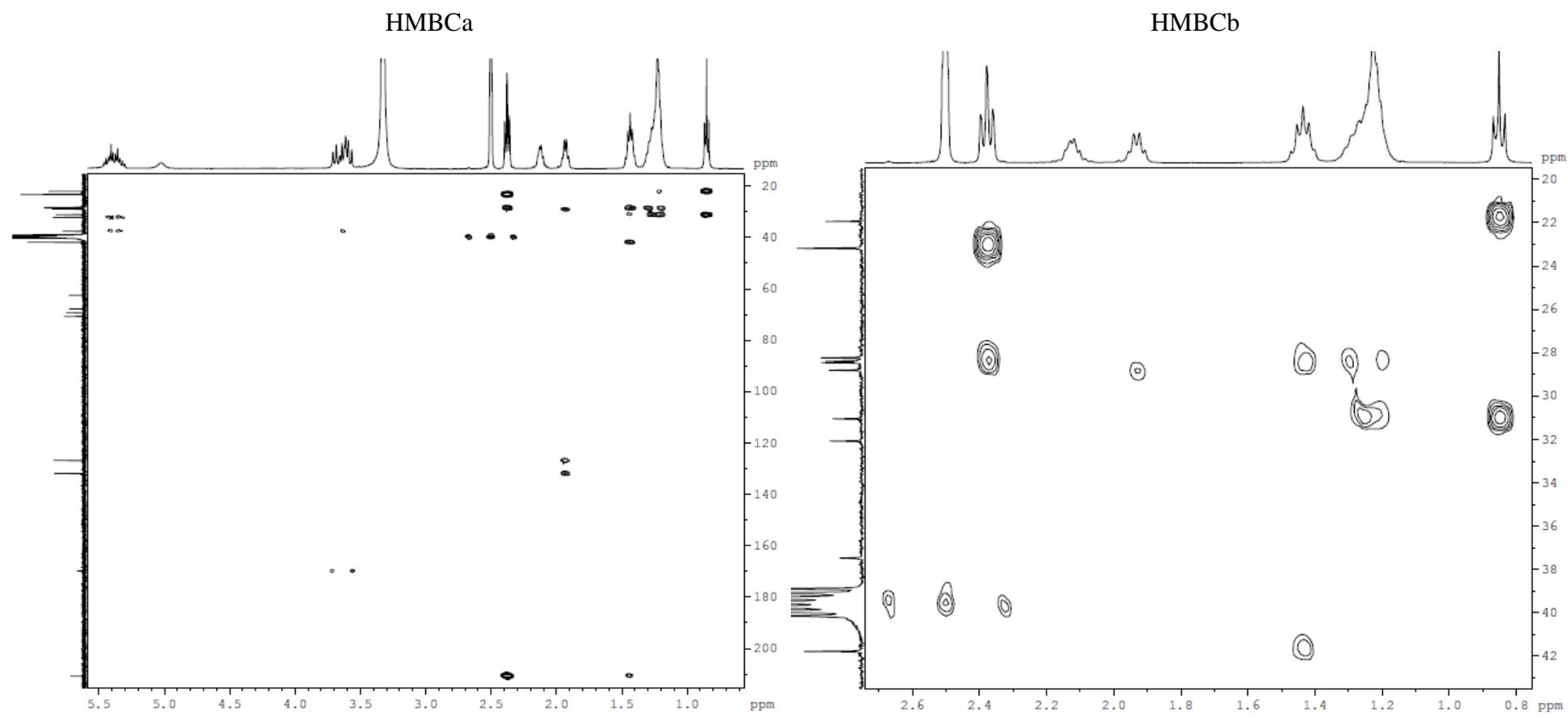


Fig. 62 – Ampliação 1 (HMBCa) e 2 (HMBCb) do mapa de contornos HMBC da substância **2** (A001.14.15).

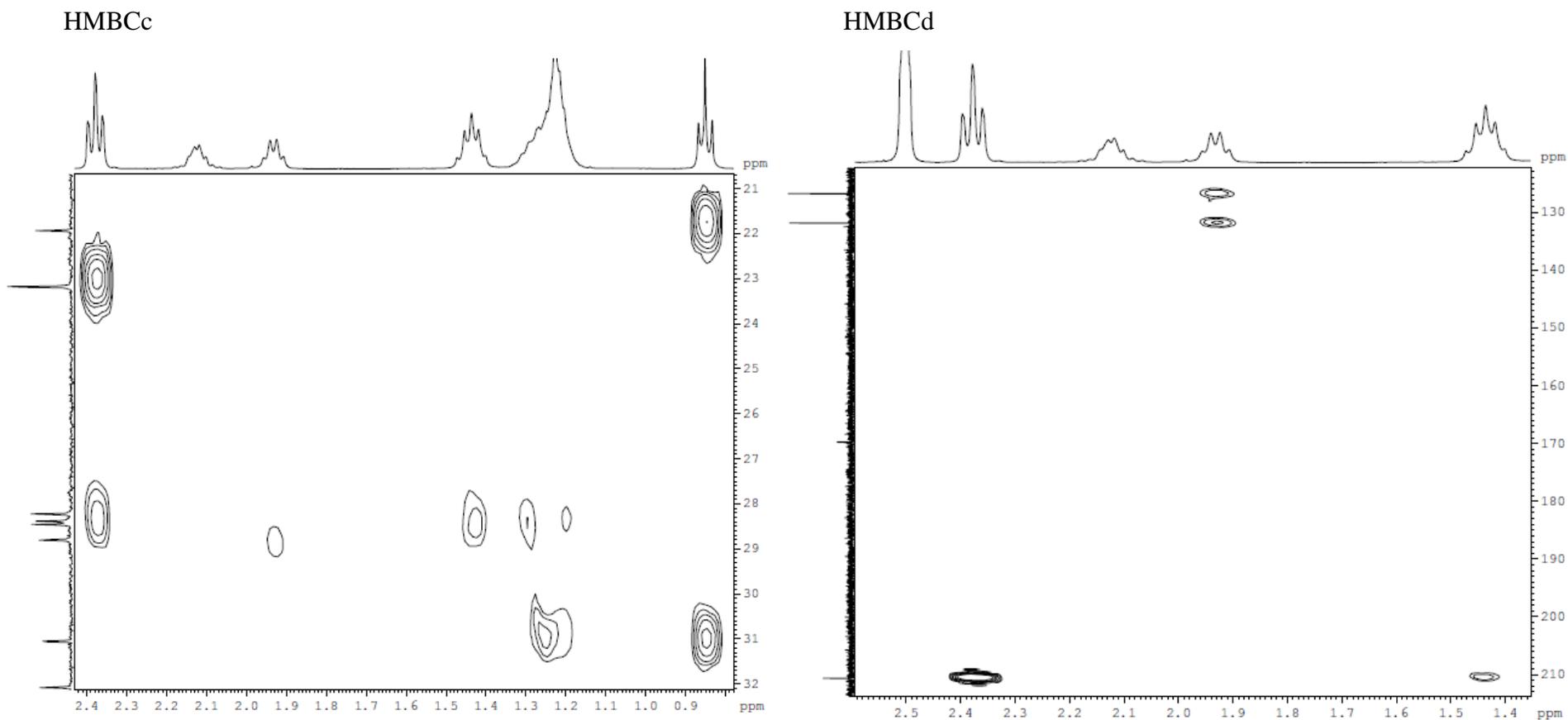
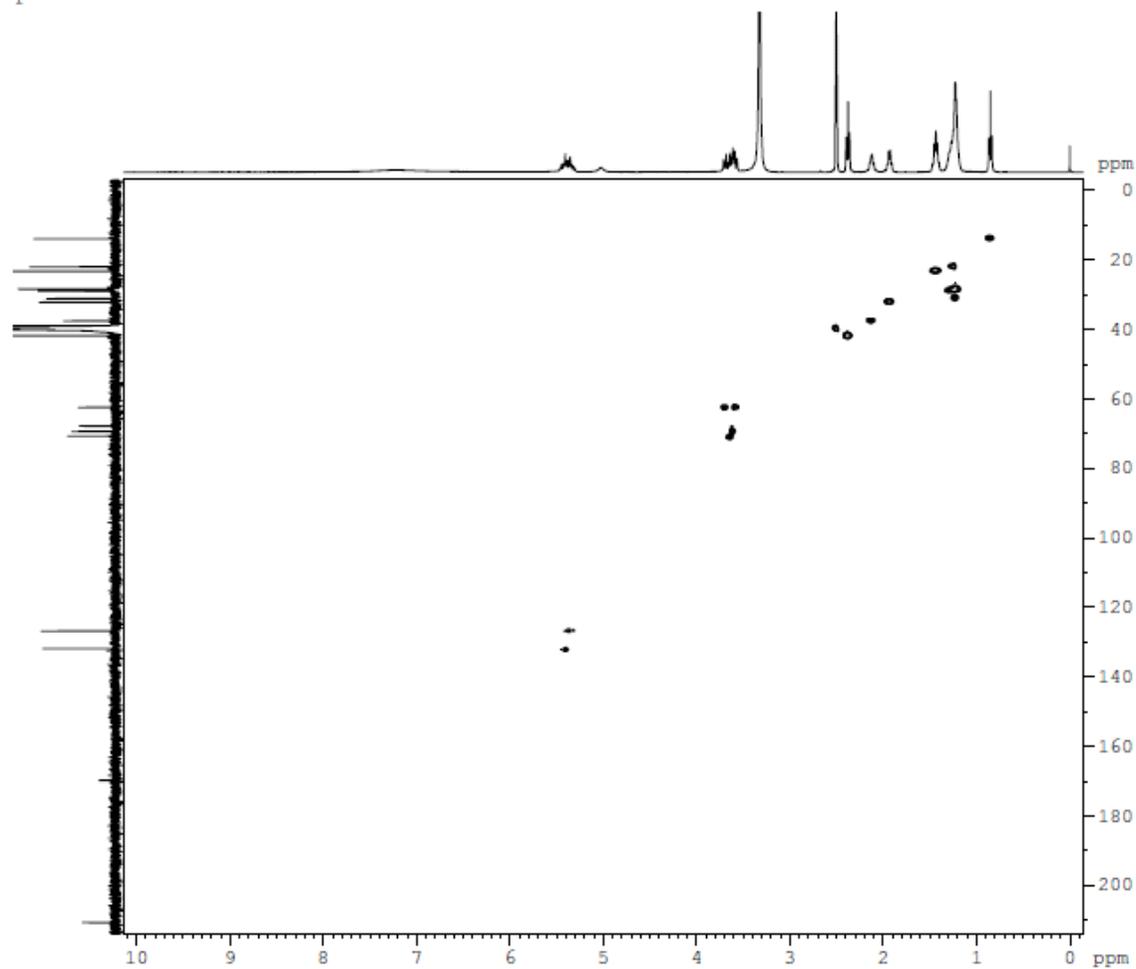


Fig. 63 – Ampliação 3 (HMBCc) e 4 (HMBCd) do mapa de contornos HMBC da substância **2** (A001.14.15).

A 001 14-15 - Cris Bigatti
Op. Eliane



```
Current Data Parameters
NAME      cpqrr03130163
EXPNO     15
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20130304
Time      22.19
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm QNP 1H/13
PULPROG   hsqcetgp
TD         2048
SOLVENT   DMSO
NS         32
DS         32
SWH        8012.820 Hz
FIDRES     3.912510 Hz
AQ         0.1278452 sec
RG         8192
DW         62.400 usec
DE         10.00 usec
TE         298.0 K
CNST2     145.0000000
d0         0.00000300 sec
d1         1.50000000 sec
d4         0.00172414 sec
d11        0.03000000 sec
d13        0.00000400 sec
d16        0.00010000 sec
DELTA     0.00113100 sec
DELTA1    0.00071614 sec
IN0        0.00002090 sec
ST1CNT    128
ZGPGPINS

===== CHANNEL f1 =====
NUC1       1H
P1         12.50 usec
P2         25.00 usec
P28        1000.00 usec
PL1        -3.00 dB
SFO1       400.1528010 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2    garp
NUC2       13C
P3         7.80 usec
P4         15.60 usec
PCPD2      70.00 usec
PL2        -4.20 dB
PL12       14.50 dB
SFO2       100.6277592 MHz

===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM1     SINE.100
GPNAM2     SINE.100
GPZ1       80.00 %
```

Fig. 64 – Espectro de HSQC da substância 2 (A001.14.15).

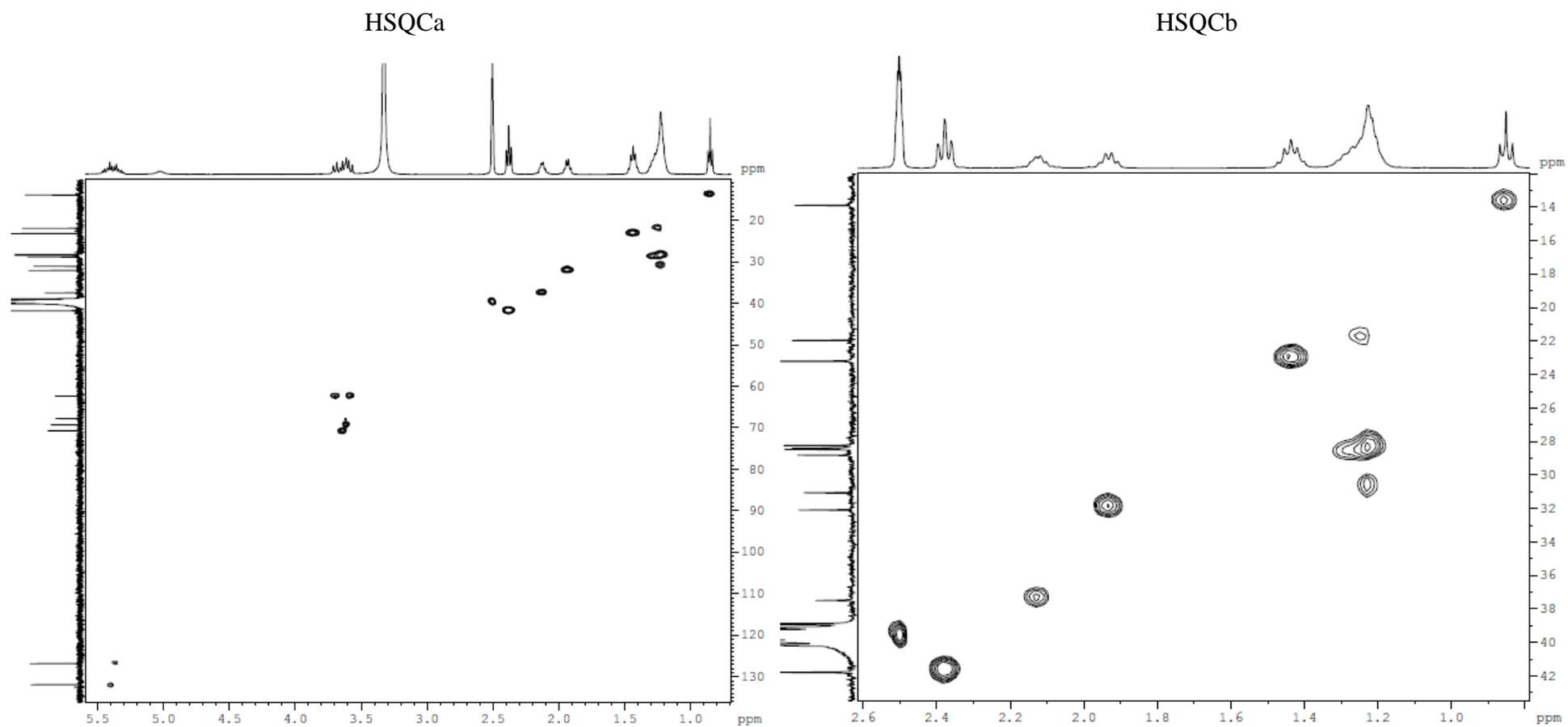


Fig. 65 – Ampliação 1 (HSQCa) e 2 (HSQCb) do mapa de contornos HSQC da substância 2 (A001.14.15).

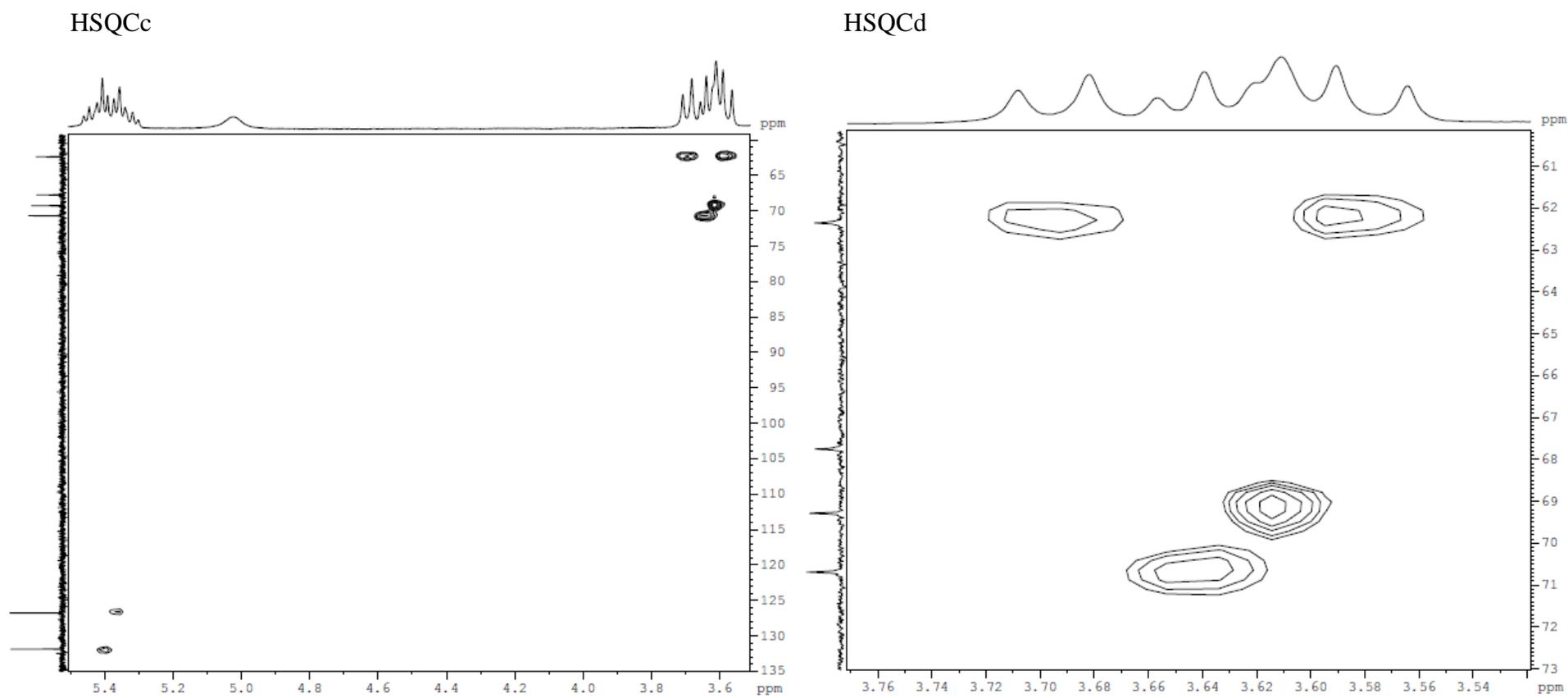
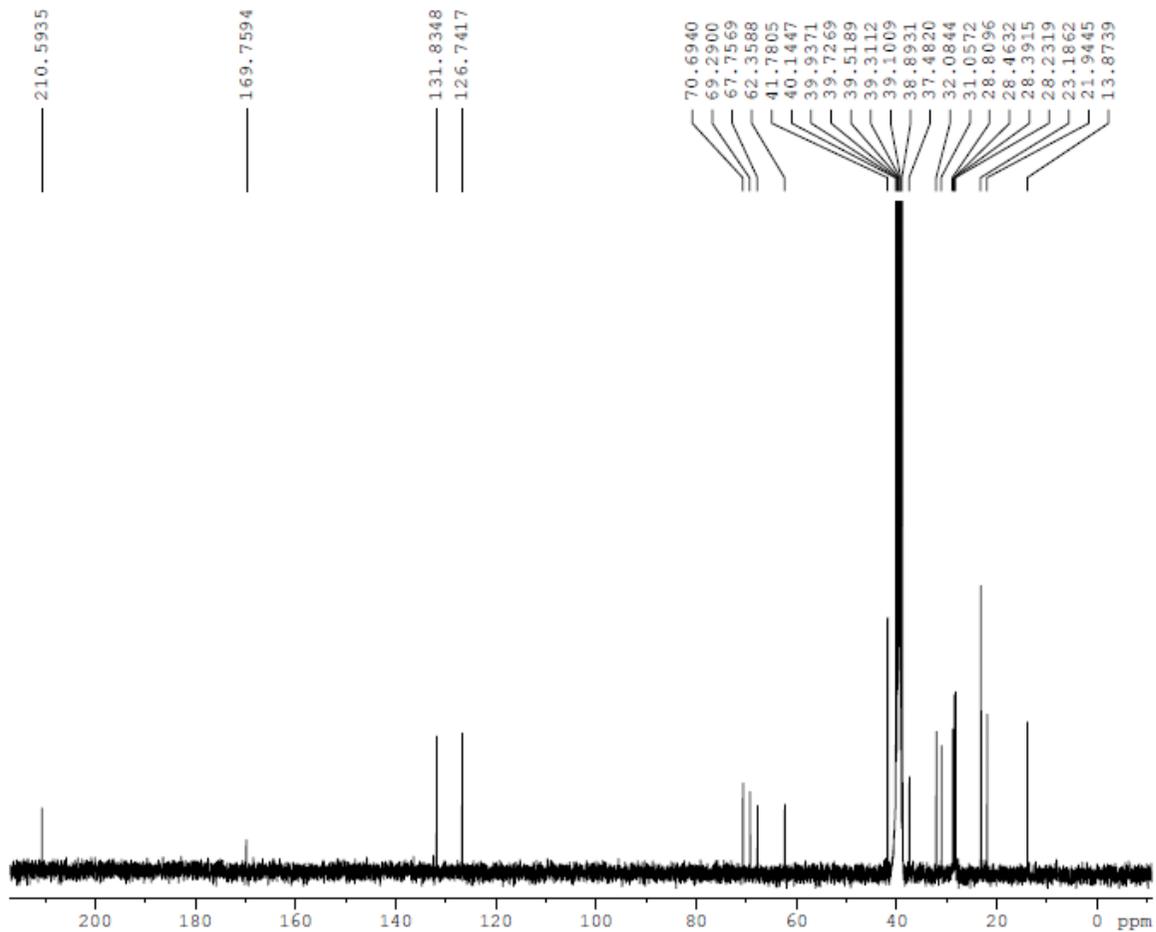


Fig. 66 – Ampliação 3 (HSQCc) e 4 (HSQCd) do mapa de contornos HSQC da substância **2** (A001.14.15).

A 001 14-15 - Cris Bigatti
Op. Eliane



```

Current Data Parameters
NAME      cpqrr03130163
EXPNO     11
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20130304
Time      12.54
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm QNP 1H/13
PULPROG   zgpg30
TD         32768
SOLVENT   DMSO
NS         10300
DS         0
SWH        23980.814 Hz
FIDRES     0.731836 Hz
AQ         0.6832628 sec
RG         16384
DW         20.850 usec
DE         6.00 usec
TE         298.0 K
D1         0.50000000 sec
d11        0.03000000 sec
DELTA     0.40000001 sec
TD0        1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1       13C
P1         7.80 usec
PL1        -4.00 dB
SFO1       100.6278593 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2    waltz16
NUC2       1H
PCPD2      80.00 usec
PL2        -3.00 dB
PL12       13.48 dB
PL13       15.00 dB
SFO2       400.1516006 MHz

F2 - Processing parameters
SI         16384
SF         100.6178469 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         1.00 Hz
GB         0
PC         1.40

```

Fig. 67 – Espectro de RMN de ^{13}C e da substância **2** - A001.14.15 (100 MHz, DMSO, δ).

A 001 14-15 - Cris Bigatti
Op. Eliane

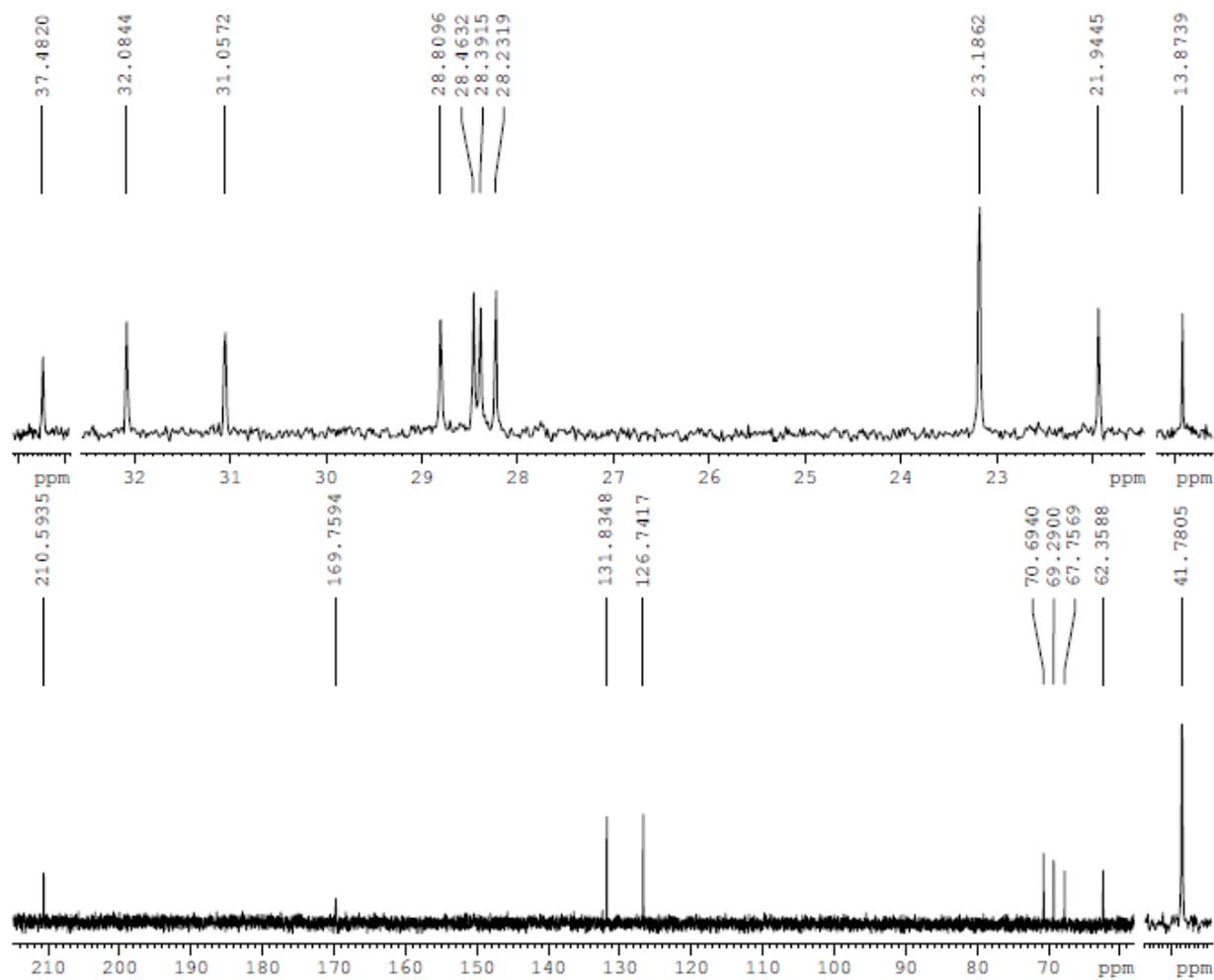
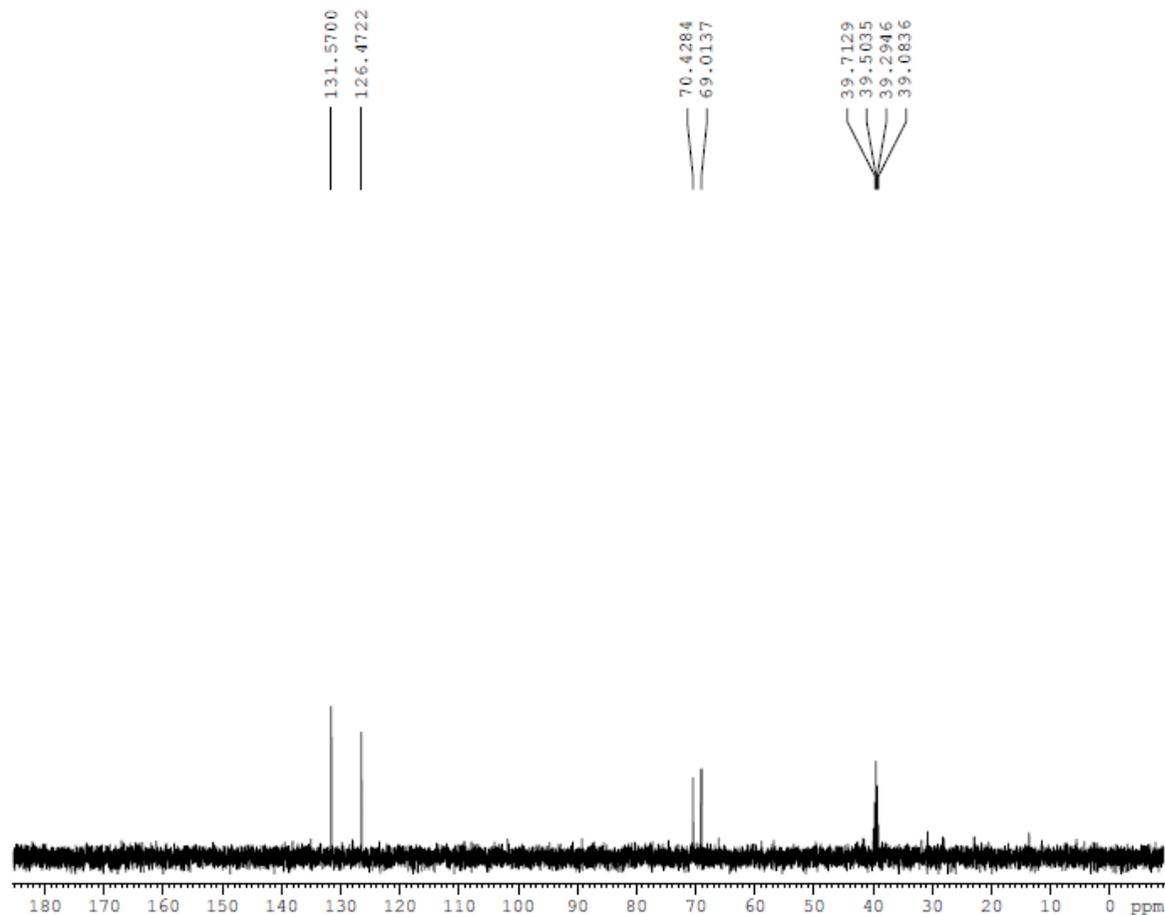


Fig. 68 – Ampliação 1 do espectro de RMN de ^{13}C da substância **2** - A001.14.15 (100 MHz, DMSO, δ).

A 001 14-15 - Cris Bigatti
Op. Eliane



```

Current Data Parameters
NAME      cpqrr03130163
EXPNO     12
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters:
Date_     20130304
Time      16.19
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm QNP 1H/13
PULPROG   dept90
TD         65536
SOLVENT   DMSO
NS         2048
DS         4
SWH        24154.590 Hz
FIDRES     0.368570 Hz
AQ         1.3566452 sec
RG         16384
DW         20.700 usec
DE         10.00 usec
TE         298.0 K
CNST2     145.0000000
d1         2.00000000 sec
d2         0.00344828 sec
d12        0.00002000 sec
DELTA     0.00000993 sec
TD0        1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1       13C
P1         7.80 usec
P2         15.60 usec
PL1        -4.00 dB
SFO1       100.6278598 MH:

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2    waltz16
NUC2       1H
P3         12.00 usec
P4         24.00 usec
PCPD2      80.00 usec
PL2        -3.00 dB
PL12       13.48 dB
SFO2       400.1516006 MH:

F2 - Processing parameters
SI         32768
SF         100.6178738 MH:
WFW        EM
SSB        0
LB         1.00 Hz
GB         0
PC         1.40
  
```

Fig. 69 – Espectro de RMN de ^{13}C (Dept-90) da substância 2 - A001.14.15 (100 MHz, DMSO, δ).

A 001 14-15 - Cris Bigatti
Op. Eliane

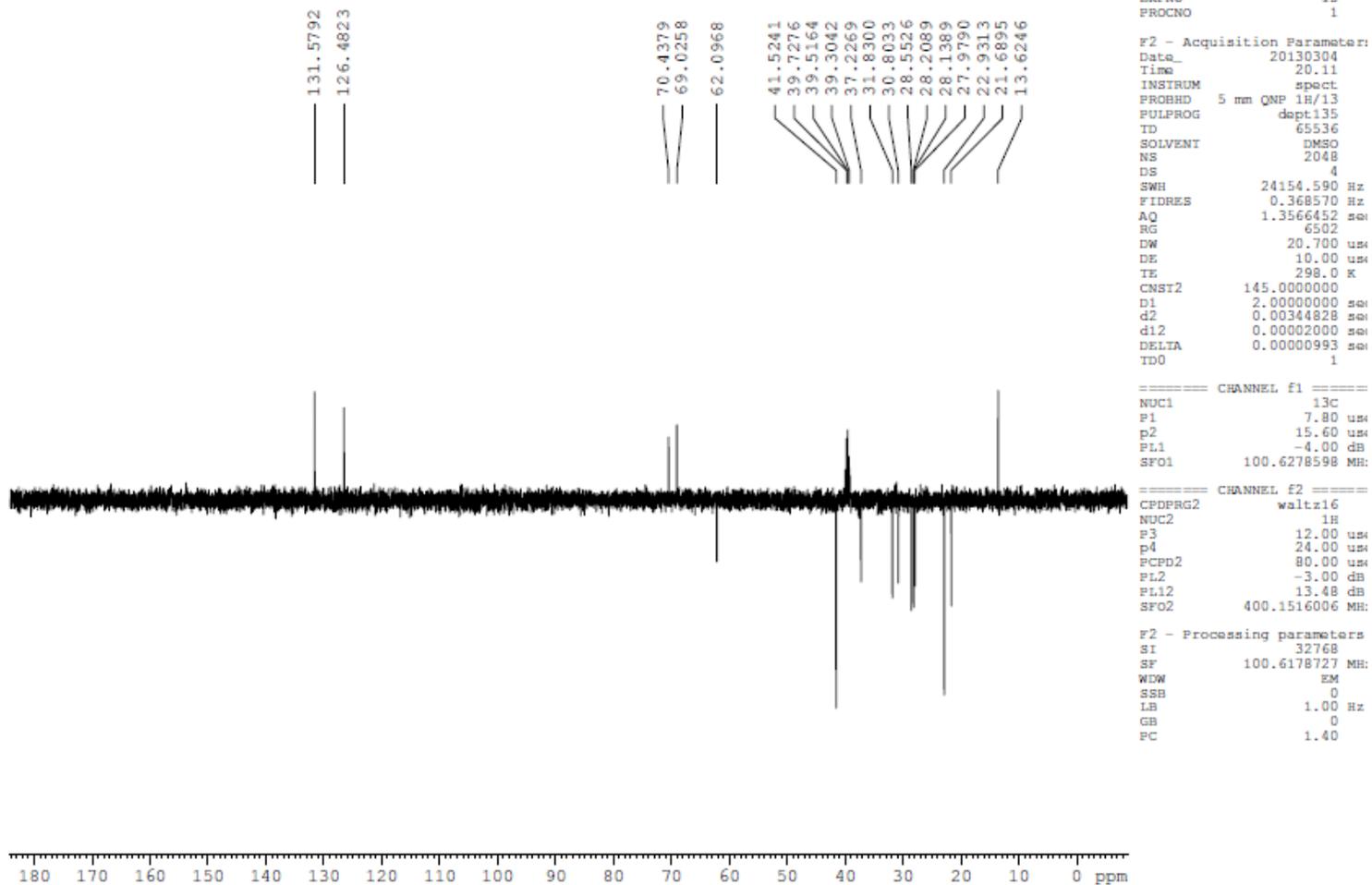


Fig. 70 – Espectro de RMN de ^{13}C (Dept-135) da substância **2** - A001.14.15 (100 MHz, DMSO, δ).

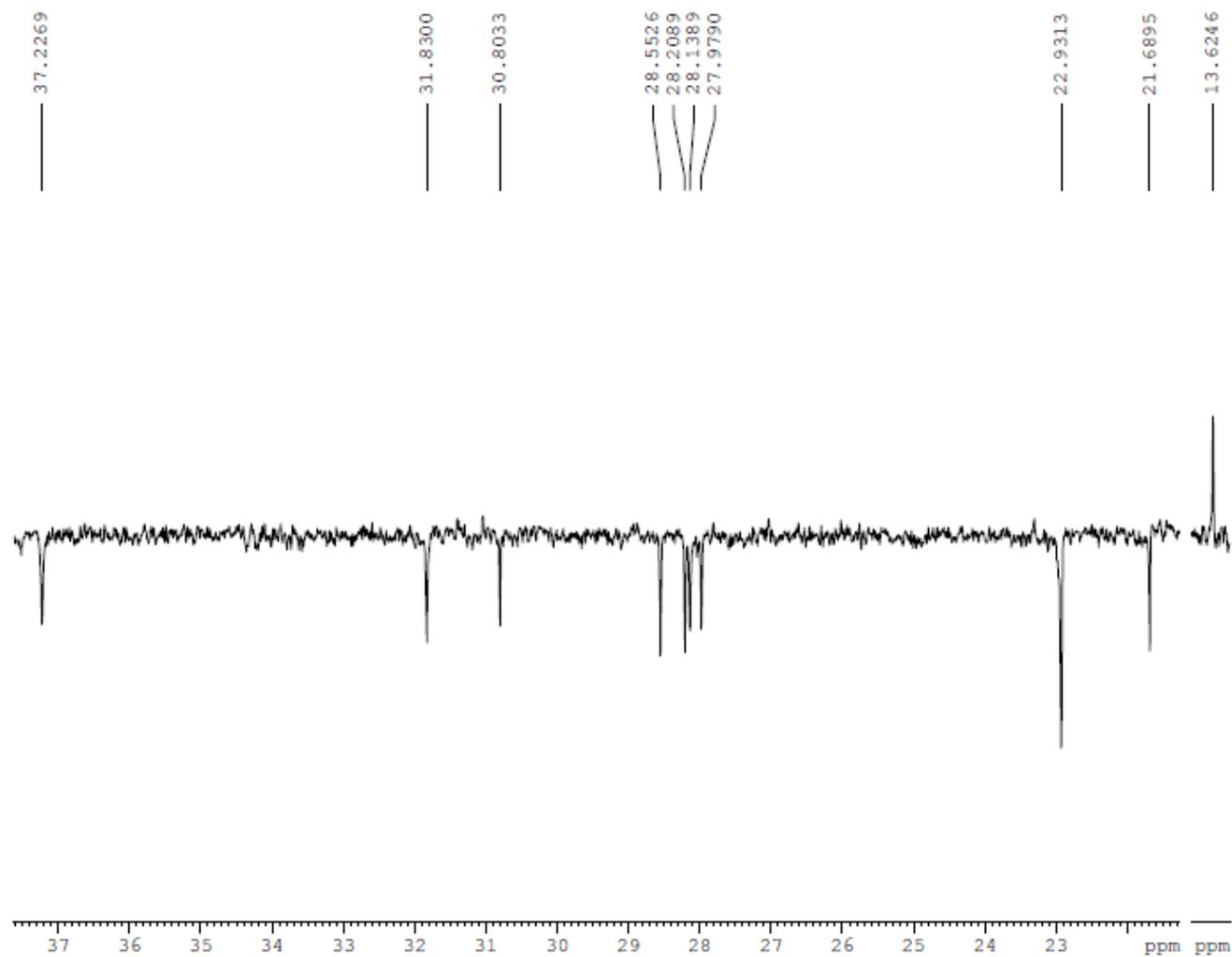


Fig. 71 – Ampliação 1 do espectro de RMN de ^{13}C (Dept-135) da substância **2** - A001.14.15 (100 MHz, DMSO, δ).

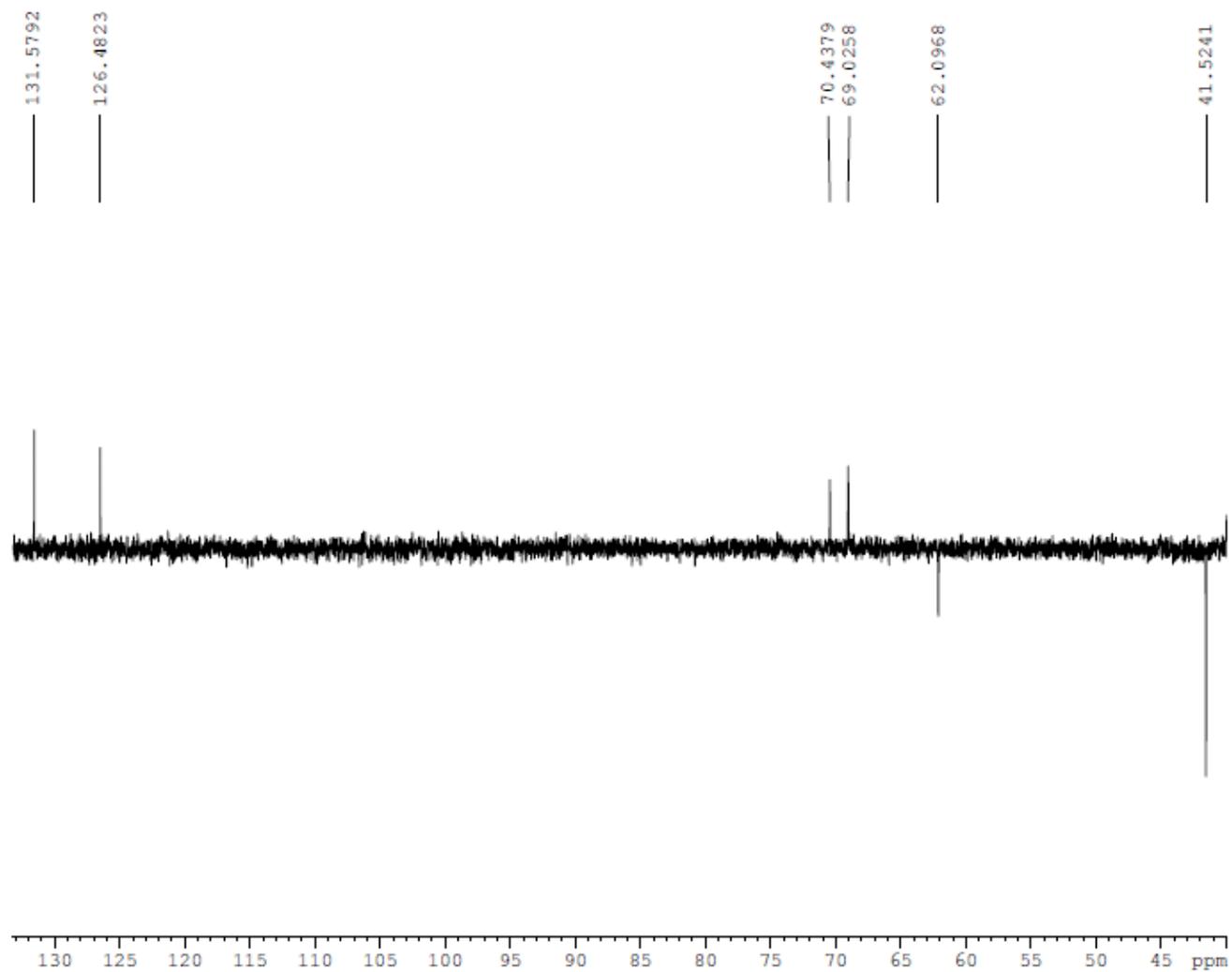


Fig. 72 – Ampliação 2 do espectro de RMN de ^{13}C (Dept-135) da substância **2** - A001.14.15 (100 MHz, DMSO, δ).