



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA BIONORTE



ATIVIDADE INIBITÓRIA DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS A PARTIR
DE PLANTAS DA FLORESTA AMAZÔNICA FRENTE
AOS AGENTES DA CRIPTOCOCOSE

KATIA SANTANA CRUZ

MANAUS – AM

FEVEREIRO – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA BIONORTE

KATIA SANTANA CRUZ

ATIVIDADE INIBITÓRIA DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS A PARTIR
DE PLANTAS DA FLORESTA AMAZÔNICA FRENTE
AOS AGENTES DA CRIPTOCOCOSE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Biodiversidade e Conservação.

Orientador: Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza

MANAUS – AM
FEVEREIRO – 2019

Ficha Catalográfica

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

C957a Cruz, Kátia Santana
Atividade inibitória de substâncias isoladas a partir de plantas da floresta amazônica frente aos agentes da criptococose / Kátia Santana Cruz. 2019
87 f.: il.; 31 cm.

Orientadora: João Vicente Braga de Souza
Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Criptococose. 2. Drogas antifúngicas. 3. Mecanismo de Ação. 4. Sensibilidade Antifúngica. 5. Região Amazônica. I. Souza, João Vicente Braga de II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

KÁTIA SANTANA CRUZ

**“ATIVIDADE INIBITÓRIA DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS A PARTIR DE
PLANTAS DA FLORESTA AMAZÔNICA FRENTE AOS AGENTES DA
CRIOPTOCOCOSE”.**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, na Universidade do Estado do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutora em Biodiversidade e Conservação.

Orientador (a): **Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza**

Co-orientador(a):

Banca Examinadora:



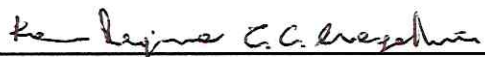
Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza (INPA)
Presidente da banca



Profa. Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura (FioCruz)
Membro



Profa. Dra. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes (FioCruz)
Membro



Profa. Dra. Karen Regina Carim da Costa Magalhães (UFAM)
Membro



Profa. Dra. Suanni Lemos de Andrade (UEA)
Membro

MANAUS – AMAZONAS
Fevereiro/2019

*À **Deus** em sua divina bondade me permitiu
chegar até aqui através de minha Fé- força de
minha alma!*

*À incansável paciência e amizade de meu
orientador **Dr. João Vicente Braga de Souza**,
um amigo onde a vida me levar;*

*A meus **pais** e seus ensinamentos que forjaram
meu caráter;*

*À minha amada filha **Clarissa** meu maior
estímulo;*

*A meu companheiro **João** pela paciência e
carinho de sempre e*

*A meus familiares, irmãos, sobrinhos, genro, o
carinho e incentivo em toda essa jornada.*

AGRADECIMENTOS

Á Deus, pela dádiva da vida e por estar sempre ao meu lado em todos os momentos;

*Ao Professor Dr. **João Vicente Braga de Souza**, meu orientador, pelos ensinamentos, conselhos, orientações, confiança, incentivo e principalmente paciência nessa jornada intensa para o desenvolvimento deste trabalho. Minha gratidão;*

*Á **Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD)**, **Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)**, **Universidade Federal do Amazonas (UFAM)** e **Universidade do Estado do Amazonas (UEA)** que ofereceram oportunidade para o aprimoramento profissional;*

*Aos coordenadores do Bionorte, Dr. **Spartaco Astolfi Filho** e Dr. **Jair Max Furtado Maia**, pela orientação e confiança na realização deste trabalho;*

Aos professores da Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia Rede-BIONORTE, pelos conhecimentos obtidos;

*Á meus companheiros de bancada Micologia FMT-HVD, **Nayara Aydar**, **Telma Maria**, **Nayara Aydar**, **Larissa Svetlana**, **Verdinho**, meus alunos **Lizandra Menescal**, **João Neto**, **Ianka Letícia**, **Valéria**, e todos os que me ajudaram a caminhar;*

*Aos integrantes da **Família Micologia**: **Alcinira Farias**, **Beatriz Pereira**, **Daiana Torres**, **Diego Fernando**, **Diego Rayan**, **Eliana Santos**, **Flávia Fernandes**, **João Neto**, **Joyce Matsuda**, **Liliane Rocha**, **Luciana Aires**, **Michele Sanches**, **Ralyvan Araújo**, **Rodrigo Ribeiro**, **Sara Jessica**, **Silviane Pinheiro** e **Walter Segundo** pelo apoio, incentivo, companheirismo e ajuda nesta jornada, sem os quais não teria conseguido realizar o presente trabalho;*

*Às minhas queridas amigas **Alita Moura** e **Ana Cortez** minha eterna gratidão;*

*Á **Direção da Fundação de Medicina Tropical**, **Marcus Guerra** e **Ana L. Guerra** meus queridos amigos que sempre me incentivaram a dar passos maiores e*

Á todos, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

“E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, se não tivesse amor, nada seria”.

RESUMO

A busca por novas drogas se constitui num dos principais desafios frente a criptococose. Essa grave doença possui terapêutica limitada ao uso da anfotericina B e fluconazol, substâncias descritas como apresentando limitações quanto a sua toxicidade, resistência microbiana e falha clínica. Nesse sentido, o *screening* de novas substâncias faz-se necessário. A presente tese possui 3 capítulos: Para compor o capítulo criptococose no Amazonas (Capítulo 1) foi realizado um levantamento bibliográfico confrontando a literatura atual e os trabalhos produzidos em nossa região. Para o *screening* de novas substâncias (Capítulo 2) foi realizada a determinação da atividade antifúngica de 15 substâncias (isoladas de plantas e semi-sintéticas) por meio da metodologia descrita pelo Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (documento M-27 A3) frente a *Cryptococcus neoformans* VNI e *C. gattii* VGII. Por fim, no Capítulo 3 foi investigado o mecanismo de ação antifúngico e a citotoxicidade das substâncias desdro-iso- α -lapachona (NAF2) e 8 nitroharmano (AHON1), para tanto foi investigado o mecanismo de ação na parede celular (ensaio com sorbitol), no ergosterol de membrana (ensaio com ergosterol exógeno) e no extravasamento celular (dosagem de substâncias que absorvem a 260 nm). A citotoxicidade dessas substâncias foi avaliada frente a linhagem MRC-5 de fibroblastos humanos em ensaio de dose-resposta. Quanto aos resultados o Capítulo 1, observou-se que criptococose no estado do Amazonas é uma doença de acomete em média 25 pessoas anualmente sendo essas principalmente homens (73%), jovens (39,2 $\pm$ 12,3, 19-68 %), portadores de HIV (70-85%). A região também apresenta em torno de 3 casos/ano de criptococose em paciente sem imunocomprometimento aparente, incluindo 1-2 casos de crianças. As principais formas clínicas da doença na região são a neurocriptococose (96%) e fungemia (42%). Quanto ao diagnóstico laboratorial, a Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado, centro de referência em infectologia da região norte, centraliza a maior parte dos diagnósticos. Os exames direto e cultura de líquor cefalorraquidiano são a forma mais comum de diagnóstico. Mais recentemente, a pesquisa com Cryptococcal Antigen Lateral Flow Assay (CrAg LFA) em amostras de sangue tem sido utilizada e destaca-se por sua sensibilidade e velocidade de execução, principalmente útil quando o paciente apresenta baixa carga fúngica (estágios iniciais da doença). Quanto aos agentes, os genótipos do complexo *Cryptococcus neoformans* são principais agentes causadores (86%), sendo que, os principais genótipos causadores na região são VNI (86%) e VGII (14%) e o principal MLST é ST93 (86%). Quanto aos resultados *screening* (Capítulo 2), dentre as 15 substâncias testadas (04 isoladas de plantas e 11 obtidas de semi-síntese) duas substâncias apresentaram atividade antifúngica destacada NAF2 e AHON1. NAF2 apresentou concentração inibitória mínima (CIM) de 80 μ g/mL frente *C. neoformans* VNI e de 160 μ g/mL frente a *C. gattii*. AHON1 apresentou CIM de 40 μ g/mL frente *C. neoformans* VNI e *C. gattii* VGII. Quanto aos resultados de mecanismo de ação e citotoxicidade (Capítulo 3), observou-se que a presença do sorbitol (ensaio de parede celular) não interferiu na CIM das substâncias NAF2 e AHON1. De forma similar, observou-se que presença do ergosterol (ensaio do ergosterol de membrana), não interferiu na CIM das mesmas. No entanto, ambas causaram extravasamento de substâncias que absorvem a 260 nm (ensaio de extravasamento). No ensaio de citotoxicidade frente a fibroblastos humanos normais (MRC-5) observou-se que, AHON1 e NAF2 possuíram IC₅₀ > 50 μ g/mL.

Palavras chaves - Criptococose, Drogas, Mecanismo de Ação, Sensibilidade Antifúngica

ABSTRACT

The search for new drugs is one of the main challenges facing cryptococcosis. This severe disease has limited therapy with the use of amphotericin B and fluconazole, substances described as having limitations on its toxicity, microbial resistance and clinical failure. In this sense, the screening of new substances is necessary. The present thesis has 3 chapters: To compose the chapter cryptococcosis in Amazonas (Chapter 1) a bibliographical survey was carried out comparing the current literature and the works produced in our region. For the screening of new substances (Chapter 2), the antifungal activity of 15 substances (plant and semi-synthetic isolates) was determined using the methodology described by the Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (document M-27 A3) the *Cryptococcus neoformans* VNI and *C. gattii* VGII. Finally, the mechanism of antifungal action and cytotoxicity of the substances desdro-iso- α -lapachone (NAF2) and 8 nitroharmano (AHON1) were investigated in Chapter 3, and the mechanism of action on the cell wall (sorbitol tests) was investigated in membrane ergosterol (exogenous ergosterol assays) and in cell extravasation (dosing of substances that absorb at 260 nm). The cytotoxicity of these substances was assessed against the MRC-5 lineage of human fibroblasts in a dose-response assay. As for Chapter 1 results, it was observed that cryptococcosis in the state of Amazonas is an illness that affects an average of 25 people annually. These are mainly men (73%), young (39.2 ± 12.3 , 19-68%), with HIV (70-85%). The region also presents around 3 cases / year of cryptococcosis in a patient without apparent immunocompromising, including 1-2 cases of children. The main clinical forms of the disease in the region are neurocryptococcosis (96%) and fungemia (42%). As for laboratory diagnosis, the Tropical Medicine Foundation Heitor Vieira Dourado, a reference center for infectology in the northern region, centralizes most of the diagnoses. Direct examinations and culture of cerebrospinal fluid are the most common form of diagnosis. More recently, the research with Cryptococcal Antigen Lateral Flow Assay (CrAg LFA) in blood samples has been used and is notable for its sensitivity and speed of execution, especially useful when the patient has low fungal load (early stages of the disease). As for the agents, *Cryptococcus neoformans* complex genotypes are the main causative agents (86%), and the main genotypes in the region are VNI (86%) and VGII (14%) and MLST is ST93 (86%). As for the screening results (Chapter 2), of the 15 substances tested (04 isolates of plants and 11 obtained from semi-synthesis), two substances showed prominent antifungal activity NAF2 and AHON1. NAF2 had a minimum inhibitory concentration (MIC) of 80 $\mu\text{g} / \text{mL}$ against *C. neoformans* VNI and 160 $\mu\text{g} / \text{mL}$ against *C. gattii*. AHON1 had MIC of 40 $\mu\text{g} / \text{mL}$ against *C. neoformans* VNI and *C. gattii* VGII. Regarding the results of mechanism of action and cytotoxicity (Chapter 3), it was observed that the presence of sorbitol (cell wall assay) did not interfere in the MIC of substances NAF2 and AHON1. Similarly, it was observed that the presence of ergosterol (membrane ergosterol assay), did not interfere with their MIC. However, both caused extravasation of substances absorbing at 260 nm (extravasation test). In the normal human fibroblast (MRC-5) cytotoxicity assay, AHON1 and NAF2 were found to have $\text{IC}_{50} > 50 \mu\text{g} / \text{mL}$.

Keywords - Cryptococcosis, Drugs, Mechanism of Action, Antifungal Sensitivity

LISTA DE QUADRO

Capítulo 1

Quadro 1. Classificações por sorotipo, PCR-fingerprint dos agentes causadores de criptococose e MLST dos genótipos regionais **36**

Quadro 2. Classificações por PCR-fingerprint dos agentes causadores de criptococose e MLST dos genótipos regionais no meio ambiente..... **38**

LISTA DE TABELAS

Introdução

Tabela 1. Fatores de risco na criptococose.....	16
Tabela 2. Formas clínicas e sintomas da criptococose.....	16
Tabela 3. Substâncias naturais, estruturas e nomenclatura IUPAC das substâncias	25
Tabela 4. Substâncias semi-sintéticas, nomenclatura IUPAC e estruturas do carbazolol e dos compostos β –carbolina.....	27

Capítulo 2

Tabela 1. Código das substâncias naturais, nomenclatura IUPAC, estrutura química e origem da substância	45
Tabela 2. Código das substâncias semi-sintéticas, nomenclatura IUPAC, estrutura química e origem da substância	46
Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) das substâncias testadas frente as espécies patogênicas do <i>Cryptococcus neoformans</i> VNI e <i>Cryptococcus gattii</i> VGII	49
Tabela 4. Concentração inibitória mínima (CIMs) das substâncias desidro-iso- α -lapachone e 8-nitroharmano frente aos genótipos do complexo <i>Cryptococcus neoformans</i> - <i>Cryptococcus gattii</i>	50

Capítulo 3

Tabela 1. Efeito do sorbitol (200–800 $\mu\text{g/mL}$) no CIM da desidro-iso- α -lapachona e 8-nitroharmano frente a <i>C. albicans</i> ATCC 36232 e <i>Cryptococcus neoformans</i> VNI	63
Tabela 2. Efeito do ergosterol exógeno (400–1600 $\mu\text{g/mL}$) na CIM da desidro-iso- α -lapachone e 8-nitroharmano e anfotericina B frente a <i>C. albicans</i> ATCC 36232 e <i>Cryptococcus neoformans</i> VNI.....	63
Tabela 3. Extravasamento de substâncias a 260 nm frente a <i>C. neoformans</i> VNI e <i>C. albicans</i> ATCC 36232 incubadas (1–6 h) com 1x e 4x CIM do 8-nitro harmano.....	65
Tabela 4. Extravasamento de substâncias a 260 nm frente a <i>C. neoformans</i> VNI <i>C. albicans</i> ATCC 36232 incubadas (1–6 h) com 1x e 4x CIM da desidro-iso- α -lapachona.....	65

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Criptococose.....	13
2.2 Tratamento da Criptococose	18
2.3 Substâncias Antifúngicas de Origem Vegetal.....	20
2.4 Substâncias Antifúngicas de Origem Semi-Sintéticas	26
3. OBJETIVOS.....	29
4. APRESENTAÇÃO DOS CAPÍTULOS.....	30
5. CAPÍTULO 1. Criptococose no estado do Amazonas: aspectos epidemiológicos, genótipos causadores e distribuição ambiental dos patógenos.....	31
6. CAPÍTULO 2. Bioprospecção de substâncias semi-sintéticas derivadas de Harman e substâncias naturais isoladas plantas para atividade contra <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>Cryptococcus gattii</i>	41
7. CAPÍTULO 3. Mecanismo de ação antifúngico e a citotoxicidade das substâncias 2-prop-1-en-2-il-2,3-di-hidrobenzo [f [1] benzofurano-4,9-diona (desidro-iso- α -lapachona) e 8 nitro-1metil-9am-Pirido [3, 4b] indol (8 nitro harmano).....	57
8. CONCLUSÕES GERAIS.....	72
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
10. APÊNDICE.....	77

1. INTRODUÇÃO

A criptococose é uma micose sistêmica adquirida por via inalatória de leveduras das espécies do complexo *Cryptococcus neoformans* e espécies do complexo de *C. gattii*. Estes patógenos são responsáveis pela morte de aproximadamente 180.000 pessoas no mundo por ano, de um total de 223.100 casos estimados pela WHO em 2014, sendo a quinta doença infecciosa mais letal, após AIDS, tuberculose, malária e diarreia (RODRIGUES, 2018).

O arsenal de drogas disponíveis para o tratamento da criptococose é reduzido, são utilizados a anfotericina B e fluconazol. A anfotericina B tem sido administrada como droga principal e fluconazol como uma droga de consolidação do tratamento (PERFECT et al., 2010). Entretanto, esses antifúngicos apresentam problemas descritos na literatura relacionados a sua toxicidade, desenvolvimento de resistência e altas frequências de falha terapêutica (STONE et al., 2019). Estima-se que 46% dos pacientes tratados com anfotericina B apresentam nefrotoxicidade (PERSONETT et al., 2019) e que apesar de estabelecido o tratamento antifúngico a falha terapêutica ainda é de 56% (CHAMMARD et al., 2018). Dessa forma, a bioprospecção de moléculas de fontes naturais tem se tornado necessária na busca de novos protótipos antifúngicos, visando tratamento mais eficaz, reduzindo exposição de pacientes a toxicidade das drogas atuais.

Sabendo-se que os laboratórios de pesquisa de produtos naturais da Amazônia possuem substâncias isoladas de espécies amazônicas que vem se acumulando ao longo dos anos de trabalho de pesquisa, uma abordagem científica de importância é avaliar essas coleções de substâncias frente a agentes causadores da criptococose. Caso algumas dessas substâncias apresentem atividade, ainda se faz necessário avaliar seu mecanismo de ação, toxicidade e a sua atividade *in vitro* e *in vivo*. Trabalhos como esses são importantes para a nossa região pois podem resultar na identificação de classes e de substâncias químicas com atividade frente a esses agentes.

Os maiores beneficiários com esta pesquisa serão estes pacientes acometidos por essa enfermidade pois a descoberta de uma nova droga de origem vegetal poderá representar uma opção que apresente menor toxicidade e assim tendo menos efeitos colaterais. Esta pesquisa pretende testar a seguinte hipótese: As substâncias provenientes de plantas da região amazônica apresentam atividade antifúngica contra *Cryptococcus* spp.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Criptococose

A criptococose é uma infecção causada pela inalação de propágulos infectantes do fungo pertencente ao Filo Basidiomycota, classe dos Tremellomycetes e ao gênero *Cryptococcus*, sendo responsáveis na maioria dos casos: as espécies do complexo *C. neoformans* e as espécies do complexo *C. gattii* que conduzem a primoinfecção pulmonar, podendo disseminar-se hematogenicamente, com especial afinidade pelo SNC, as quais diferem em aspectos bioquímicos, biológicos, ecológicos, antigênicos e genéticos (KWONG-CHUNG et al., 2017).

O gênero *Cryptococcus* deriva da palavra grega *kryptus* que significa oculto, designação criada por Kutzig em 1833, aspectos clínicos, patologia e micologia da Criptococose e seu agente foram primeiramente descritos pelos médicos alemães Busse em 1894 que o denominou *Saccharomyces hominis* e Buschke em 1895 como coccídeo, descreveram separadamente a infecção em paciente do sexo feminino que apresentou sarcoma em tíbia infectada com disseminação em pele, ossos, rins, pulmões e fígado (PERFECT & CASADEVAL, 2011). Sanfelice, na Itália, na mesma época, a partir de suco de pêsego realizou o primeiro isolamento ambiental de levedura capsulada então denominada *Saccharomyces neoformans*. Em 1901 foi renomeado por Jean-Paul Vuillemin como *Cryptococcus neoformans* por não formar ascósporos. Em 1905, von Hansemann relatou o primeiro caso de criptococose meningoencefálica (NEGRONI, 2012).

A criptococose no mundo teve sua incidência aumentada com o aparecimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), sendo a meningite, causada por leveduras do complexo *Cryptococcus neoformans* e complexo *C. gattii* sua principal apresentação clínica (GULLO, 2013). Em estudo realizado por Rajasingham et al. (2017) o percentual de pessoas portadoras do vírus HIV com contagem de células CD4 < 100cll/ μ L, que apresentaram antigenemia por antígeno criptocócico foi de 6% assim estima-se que anualmente, 278 000 pessoas têm antigenemia criptocócica, com 73% dos casos de meningite ocorridos na África Subsaariana. Meningite criptocócica provoca 15% de mortes relacionadas com a AIDS globalmente. No Brasil, existe pouca informação quanto ao número de casos e óbitos, pois a doença não é de notificação compulsória.

Levantamento realizado no período de 2000 a 2012 em notificações de óbito obtidas do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) foram registrados 5755 óbitos com criptococose, por total de menções, sendo que 1121 tinham esta micose como causa básica e em 4314 registros (75%) estavam associados à AIDS. No Amazonas, estudo realizado por Rocha et al. (2018) no período de 2014 a 2016, mostrou o número de acometidos 26 e a mortalidade de 54%.

Técnicas moleculares tem sido utilizada e desenvolvida para caracterização dos agentes causadores da criptococose. Essas técnicas têm evoluído e sendo amplamente aplicadas desde o surto de criptococose em Vancouver, Columbia Britânica, em 2002 (BARTLETT et al., 2012). Entre as técnicas de caracterização deve-se destacar: a) A PCR fingerprinting usando primers específicos para microssatélites; b) Amplified fragment length polymorphism (AFLP); c) Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) e d) Multi Locus Sequence Typing (MLST). Atualmente, constituem o complexo *C. neoformans* os tipos moleculares VNI, VNII, VNIII e VNIV. Constituem o complexo *C. gattii* os tipos moleculares VGI, VGIIa, VGIIb, VGIII e VGIV (COGLIATI, 2013).

No mundo, o padrão molecular mais comum do complexo *C. neoformans* é o VNI e o padrão molecular mais importante do complexo *C. gattii* é o VGII. Esse último tem sido principalmente isolado na América do Sul América, América do Norte e Oceania (COGLIATI, 2013). No Brasil, observa-se a predominância do tipo molecular VNI e ainda infecções pelos tipos moleculares VNII e VGII. Sendo que, o tipo molecular VNI associado a infecção de pacientes com HIV-AIDS e VGII associado a infecção de pacientes sem imunocomprometimento aparente (TRILLES et al., 2008). De forma similar, no Amazonas, os genótipos VNI e VGII são os principais causadores da criptococose na região (ROCHA et al., 2018).

Os agentes do complexo *C. neoformans* tem distribuição mundial e suas principais fontes ambientais são o solo contaminado com fezes de aves e de animais em cativeiro. Os agentes do complexo *C. gattii* são observados em climas tropicais e subtropicais associados a resíduos vegetais em decomposição. Esses últimos já foram isolados de espécies de árvores como *Eucalyptus camaldulensis* na Austrália e México, *Terminalia cattapa* na Colômbia e *Sygium jambola*, *Cassia grandis*, *Senna multijuga*, *Ficus microcarpa* e *Tomentuettarda acreana* no Brasil (BARNETT et al., 2010; BRITO-SANTOS et al., 2015; ALVES et al., 2016).

A infecção pela doença ocorre após inalação propágulos infecciosos dos agentes de fontes ambientais. Dessa forma o agente pode se disseminar, provavelmente em muitos casos, após um período latente contido dentro de linfonodos do pulmão. Já tendo sido observado em quase todos os órgãos e tecidos, *Cryptococcus* spp. tem forte predileção pelo Sistema Nervoso Central. Este neurotropismo tem sido associado a uma série de fatores criptocócicos específicos de virulência que facilitam a penetração do sangue-barreira do cérebro, tais como metaloproteinases e ureases específicas; enzimas que causam neuroimunomodulação, como a lacase que utiliza dopamina; e mecanismos que facilitam a sobrevivência dentro do ambiente carente de nutrientes do cérebro (WILLIAMSON et al., 2017).

Ainda sobre a infecção, estudo recentes demonstram que os agentes causadores da criptococose atravessam a barreira hematoencefálica (BHE) na vasculatura capilar, diretamente ou dentro de macrófago denominado "Cavalo de Tróia" "ou ambos, e alcançando os espaços de Virchow-Robin e / ou espaço subaracnoidal. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar como as células criptocócicas atravessam a BHE e os fatores fúngicos que a promovem, mas que mecanismo (s) provavelmente ocorrerão durante a infecção em humanos ainda é desconhecido. Outros fatores de virulência deste patógenos são a termotolerância, aquisição de nutrientes, cápsula, melanina e lacase, urease, fosfolipases, defesas oxidativas, proteína antifogocítica 1 (COELHO et al., 2014).

A predisposição dos pacientes HIV-AIDS para infecção por criptococose foi descrita por Gibson et al. (2015). A infecção pelo HIV afeta a determinação do perfil Th1 vs Th2, já que tanto o aumento da carga viral quanto a diminuição da contagem de células CD4 levam a elevação da IL4 em relação ao IFN γ . Além disso, a morte de *Cryptococcus* mediada por granulinas de células T CD4 + não é ativada em células de pacientes com HIV. Através de estudo murino de HIV infectado por *Cryptococcus* foram observados níveis reduzidos de quimiocinas CCL2 e CCL5, que são atrativos de células imunes, em comparação com camundongos não infectados. Logo, a infecção pelo HIV pode levar a defeitos específicos de recrutamento de células imunes inatas, bem como desequilíbrio imunológico geral, o que reduzirá ainda mais a capacidade do hospedeiro de combater o patógeno.

Tabela 1 – Fatores de risco na criptococose

Fatores de Risco na Criptococose	
Infecção pelo HIV	Anticorpos anti-GM do LCR
Terapias Imunossupressivas/Corticóide	Doenças reumatológicas (lúpus, artrite reumatoide)
Transplante de Órgãos	Idiopatia CD4 linfopenia
Desordens Linfoproliferativas /Câncer	Doença crônica de fígado, Falência renal ou diálise peritoneal
Sarcoidose	Síndrome Hiper IgM ou IgE
Tratamento com Anticorpos Monoclonais	Diabetes melitus

Fonte: Adaptado de MAZIARZ & PERFECT, 2016.

Quanto as formas clínicas, a micose abrange duas entidades distintas do ponto de vista clínico e epidemiológico: a) Criptococose oportunista, cosmopolita, associada a condições de imunodepressão celular causada predominantemente por *C. neoformans*; b) Criptococose primária de hospedeiro aparentemente imunocompetente, endêmica em áreas tropicais e subtropicais, causada predominantemente por *C. gattii*. As principais formas clínicas dessa doença são a neurocriptococose e a fungemia (KON et al., 2008). As formas clínicas da Criptococose são definidas de acordo com a tabela abaixo:

Tabela 2 – Formas clínicas e sintomas na criptococose

Formas Clínicas na Criptococose	Sintomas
Infecção Pulmonar- Primária	Multiplos nódulos, infiltrado pulmonar, tosse, febre e astenia
Meningite Criptocócica (SNC)	Dor de cabeça, rigidez de nuca, vômito em jato, neuropatia cranial e letargia
Lesões de Pele	Normalmente indistinguível de outras lesões
Infecções de Próstata	Assintomática
Infecções Oculares	Paralisia ocular e papiledema
Outros Sítios Corpóreos	Ossos e peritônio

Fonte: Adaptado de MAZIARZ & PERFECT, 2016.

Segundo a UNAIDS (2012) com a introdução na década de 90 da chamada terapia anti retroviral, inicialmente denominada HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) ou TARV, que é a combinação dos inibidores de protease e transcriptase reversa, extremamente efetiva na redução da carga viral plasmática de RNA-HIV-1 para níveis indetectáveis, houve uma redução de óbitos e de agravamento dos quadros das principais doenças oportunistas que acometem os pacientes HIV.

O diagnóstico da criptococose, se baseia, na presença de cápsula característica (exame direto), cultivo (principal suporte para tratamento), diagnóstico imunológico (detecta infecção subclínica) e coloração tecidual específica (WILLIAMSON et al., 2017; CHAMMARD et al., 2018).

- Microscopia - A levedura pode ser vista no escarro, lavado brônquico, LCR (Líquor Céfalorraquidiano), pus de abscesso, urina, aspirados de medula óssea e de gânglios, fragmentos de tecidos, com grande sensibilidade. No LCR a microscopia é positiva quando há 10^3 UFC /mL de células fúngicas, não sendo preditora de evolução. O exame do Líquor através da nigrosina (tinta da China) demonstra, em contraste negativo, as leveduras encapsuladas com uma sensibilidade em torno de 80%, mas pode ser menor em pacientes HIV-negativos em associação com uma baixa carga fúngica. A centrifugação do LCR por 10 minutos aumenta a sensibilidade (CHAMMARD et al., 2018)
- Cultivo - A cultura é o exame comprobatório da doença. *Cryptococcus* cresce bem em vários meios que não contenham ciclo-heximida: ágar Sabouraud e ágar infusão de cérebro-coração e ágar Níger nas temperaturas de 25 °C e 37 °C. Colônias mucoides de tonalidade creme em 48h de incubação. Em meio de CGB (Canavanina-Glicina-Bromotimol) permite a separação de *C. gattii* do *C. neoformans*. Em meio de cultura ágar Níger (Seed Niger) através da utilização da fenoloxidase o *Cryptococcus* spp. promove oxidação do ácido cafeico (KWONG-CHUNG & BENNETT, 1999).
- Diagnóstico imunológico - A detecção de antígeno capsular polissacarídeo de *Cryptococcus* pela aglutinação do látex, pode ser realizada no sangue, urina, lavado brônquio alveolar e no LCR. No entanto, na prática, a detecção de antígeno é feita no LCR e no soro. Outro teste para detecção de antígeno é o *Cryptococcus* Teste Rápido - CrAg – Teste Imunocromatográfico que utiliza o sistema sanduiche, é realizado em LCR, soro e plasma. Através de uma tira teste, contendo uma película que possui região impregnada com anticorpos anti *Cryptococcus* monoclonais conjugados ouro coloidal. Este ensaio oferece uma série de benefícios sobre os métodos prévios, incluindo a precisão (IDNURAM et al., 2015)

2.2 Tratamento da Criptococose

O primeiro documento que estabeleceu diretrizes para o tratamento da criptococose foi criado no ano de 2000 pela Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA) na tentativa de padronizar o tratamento que depende tanto dos sítios anatômicos de envolvimento como do estado imunológico do hospedeiro (SAAG et al., 2000). Revisão de tais diretrizes foi realizada por especialistas da IDSA levando-se em conta a experiência adquirida através do manejo de pacientes, assim como da introdução de novas técnicas de diagnóstico e acompanhamento da criptococose (PERFECT et al., 2010).

Lançado em 2018 pela WHO, nova revisão das diretrizes para o diagnóstico, prevenção e manejo da doença criptocócica em adultos, adolescentes e crianças infectados pelo HIV traz orientações principalmente para direcionar os tratamentos concomitantes, como os medicamentos antirretrovirais, na principal apresentação clínica da doença que é a meningite criptocócica e o tratamento segue o seguinte esquema (WHO, 2018):

A) Indução de curso (uma semana) para adultos, adolescentes e crianças:

Anfotericina B desoxicolato (1,0 mg/kg/dia) + flucitosina (100 mg/kg/dia, / em quatro doses por dia) e fluconazol por 1 semana (1200 mg/dia para adultos, 12 mg/kg/dia para crianças e adolescentes), até uma dose máxima de 800mg diários ou como alternativa.

B) Opções alternativas, dependendo da disponibilidade de medicamentos:

Fluconazol por 2 semanas (1200 mg diários para adultos, 12 mg/kg/dia para crianças e adolescentes) + flucitosina (100 mg/kg/dia, dividida em quatro doses por dia e anfotericina B desoxicolato por 2 semanas (1,0 mg/kg/dia) + fluconazol (1200 mg diários para adultos, 12 mg/kg/dia para crianças e adolescentes), até um máximo de 800 mg diários.

C) Consolidação:

Fluconazol (800 mg diários para adultos, 6 – 12 mg/kg/dia para crianças e adolescentes até um máximo de 800 mg diários) é recomendada para a fase de consolidação (durante oito semanas após a fase de indução).

D) Manutenção ou profilaxia secundária:

Fluconazol (200 mg diários para adultos, 6 mg/kg/dia para adolescentes e crianças).

Segundo o documento, o início da terapia TARV (anti retrovirais) não é recomendada para adultos, adolescentes e crianças vivendo com HIV que têm Meningite criptocócica devido ao risco de aumento da mortalidade e deve ser adiada por 4 – 6 semanas a partir do início do tratamento antifúngico (WHO, 2018).

Ainda, segundo WHO (2018), nos pacientes com baixo risco para a falha terapêutica sem diagnóstico de doença subjacente será obedecido o seguinte esquema terapêutico:

A) Indução:

Anfotericina B + flucitosina (apenas 2 semanas);

B) Consolidação:

Fluconazol (800mg (12mg/kg) ao dia por via oral) por 8 semanas e

C) Manutenção:

Fluconazol (200 mg/dia (3 mg/kg) por o dia por via oral) por 6 – 12 meses.

De acordo com o Consenso Criptococose 2018 nas formas graves, principalmente de SNC, seja o paciente infectado ou não pelo HIV, a fase de indução tem por objetivo negativação ou redução efetiva da carga fúngica. A fase de consolidação compreende manutenção de negatividade micológica. Segue-se a fase de supressão também chamada de manutenção, por mínimo de 1 ano com tempo adicional variando de acordo com a condição do estado imune do hospedeiro. Foram descritos casos de aparecimento de resistência ao fluconazol e itraconazol durante a terapia de manutenção.

O tratamento é realizado em três fases: indução, consolidação e manutenção, com o objetivo de erradicar o micro-organismo evitando assim sequelas neurológicas e casos fatais. Os antibióticos utilizados são anfotericina B, formulações lipídicas (complexo lipídico e lipossomal) e fluocitosina (5F).

A nefrotoxicidade da anfotericina B, e a resistência provocada pelo fluconazol, principais medicações utilizadas tornam necessário acompanhamento criterioso aos pacientes com criptococose (COELHO et al., 2014; FELICIANO et al., 2017; MOURAD & PERFECT, 2018).

Alterações na sensibilidade de *C. neoformans* ao fluconazol foram descritos e atribuídos ao fenômeno de efluxo por diminuição de droga no interior celular, acontece através de transporte ativo e é mediada através da glicoproteína P ou por outras proteínas como MFS (principal super família facilitadora). E ainda, a resistência em *C. gattii* entre pacientes com AIDS que desenvolvem criptococose ocorre durante a terapia de manutenção com o azólico fluconazol, o fungo gera um mecanismo capaz de sobrepujar

a ação do antifúngico, levando a recidiva da doença (LOYSE et al., 2013; PERFECT et al., 2010)

O prognóstico pobre no tratamento da criptococose tem resultado na necessidade de exploração de tratamentos alternativos como, imunização passiva, imunoterapia e estratégias baseadas em citocinas, são algumas das novas propostas (PIROFSKY & CASADEVAL, 2017).

2.3 Substâncias Antifúngicas de Origem Vegetal

Estima-se que o tempo gasto entre a descoberta de uma nova droga até sua utilização clínica seja de 12 anos, envolvendo gastos em torno de um bilhão de dólares no contexto atual. A descoberta de novas drogas, envolve a descoberta de novas entidades químicas e essas podem advir tanto de sínteses químicas quanto de isolamento de produtos naturais. Uma análise realizada sobre publicações da última década do Journal of Natural Products, revelou que diferentes organismos foram investigados por propriedades antifúngicas sendo: 41% plantas, 34% fungos, 20% organismos marinhos e 5% bactérias. Ainda segundo esta publicação, na América Latina se encontram seis dos países de maior diversidade biológica no mundo (KATIYAR et al., 2012; CRAGG & NEWMAN, 2014).

Apesar de intensos estudos, apenas 6% das cerca de 300.000 espécies de plantas superiores têm sido sistematicamente investigados farmacologicamente e apenas cerca de 15% fitoquimicamente (CRAGG & NEWMAN, 2014).

Plantas têm habilidade quase ilimitada de sintetizar substâncias aromáticas de diferentes grupos funcionais, sendo a maioria metabólitos secundários, usados em sua defesa, contra micro-organismos, insetos e herbívoros. Algumas destas substâncias usadas por seu odor (terpenoides), pigmentos (quinonas e taninos) e sabor (terpenóides, capsaicina extraída da pimenta) são usadas também por suas propriedades medicinais (PETROVSKA, 2012).

2.3.1 Fenóis e Ácidos Fenólicos

Plantas pertencentes as famílias Ranunculaceae, Rhamnaceae e Piperaceae são produtoras de fenóis e ácidos fenólicos. Estudos recentes têm relatado atividade antifúngica em compostos fenólicos de fontes naturais. A posição dos grupos hidroxila

nos grupos fenólicos conferem de acordo com estudos, a toxicidade ao micro-organismo, e aumento da oxidação resulta em aumento da toxicidade. Tarragona e Thyme são plantas que possuem ácido caféico, representante do enorme grupo de compostos derivados do Fenilpropano, que possuem atividade antifúngica por mecanismo de inibição enzimática pela oxidação de compostos (VIDYASAGAR & SINGH, 2014).

2.3.2 Flavonoides

Plantas pertencentes as famílias Fabaceae, Ranunculaceae, Asteraceae são produtoras de flavonoides, substâncias fenólicas hidroxiladas, sintetizadas pelas plantas em resposta a infecção microbial. Esta atividade é creditada a sua capacidade de se complexar com proteínas solúveis e extracelulares além de se complexar com a parede de células fúngicas. A natureza lipofílica dos flavonoides pode também desestabilizar a parede das células fúngicas (FRANCISCO et al., 2011).

2.3.3 Lignanas e Neolignanas

Plantas pertencentes a família piperaceae são produtoras de lignanas e neolignanas que compreendem uma classe de produtos naturais que possui grande diversidade de estruturas químicas e atividades farmacológicas. Sendo formadas pelo acoplamento de duas unidades fenilpropanoides (eugenol, álcool coniferílico, isoeugenol, etc.). A forma como estas unidades são ligadas entre si determinam sua classificação: as lignanas ligam-se pela posição 8 e 8' da cadeia alifática, enquanto que as neolignanas são geradas pela ligação de qualquer outra posição da unidade fenilpropanoides que não seja 8 e 8'. As lignanas são acumuladas em madeiras como resposta a ferimentos mecânicos ou a invasão de fungos ou bactérias (SOUZA et al., 2012).

2.3.4 Limonóides e Protolimonoides

São os maiores representantes da classe dos terpenos com metabólitos que apresentam uma gama de atividades biológicas, principalmente inseticidas. Encontrado em plantas da família Meliaceae. É constituído principalmente de material saponificável, onde se destacam derivados dos ácidos graxos palmítico, oleico, esteárico e linoleico. Contudo, contém normalmente cerca de 5% de material insaponificável, no qual se destacam os Limonóides 17 β -hidroxiazadiradiona, xilocesina k, gedunina, 6-a-

acetoxigedunina, 7-desacetoxi-7-oxogedunina, 1,2-di-hidro-3-b-hidroxi-7-desacetoxi-7-oxogedunina e angolensato de metila (JÚNIOR, 2003).

2.3.5 Saponinas

As saponinas são metabólitos secundários que ocorrem em grande variedade de espécies de plantas, principalmente na família Solanaceae. São armazenados em células de plantas como precursores inativos, mas são prontamente convertidos em antibióticos ativos por enzimas biológicas em resposta a ataque de patógenos. As saponinas são compostos glicosilados amplamente distribuídos e podem ser divididos em três grupos principais, um triterpenoide, uma esteróides ou glicoalcalóides um esteróide ou glicoalcalóide esteroide. Demonstraram atividade em pesquisas realizadas frente a fungos da classe dos dermatófitos e a *Candida* spp. (CRUZ-SILVA et al., 2016).

2.3.6 Cumarinas

Cumarinas são substâncias encontradas em plantas da família Meliaceae. Foram relatados como capazes de estimular macrófagos que poderiam ter um efeito negativo indireto sobre infecções. As cumarinas são substâncias fenólicas que possuem anéis de benzeno e α -pirona fundidas. Sua fama vêm principalmente da sua antitrombótica, anti-inflamatório e vasodilatador atividades e seu uso para prevenir recorrências de herpes labial causado por HSV-1 em seres humanos. Hidroxicumarina escopoletina relatado com atividade antifúngica contra *Fusarium verticillioides* (JARVIS et al., 2013).

2.3.7 Xantonas e Metilxantina

Xantonas são um grupo restrito de polifenóis de plantas, encontrados na família Clusiaceae, biossinteticamente relacionadas com os flavonóides. Xantonas são uma classe de compostos heterocíclicos contendo oxigênio, com uma coloração amarela e todos eles têm dibenzo- γ -pirona como a base esqueleto (SOARES, 2002).

Um dos principais fatores associados às xantonas que determinam seus possíveis efeitos biológicos é sua diversidade. São descritas pela literatura algumas

subclassificações que variam de acordo com os radicais associados a estrutura básica das xantonas (NOUNGOUE, 2006).

2.3.8 Terpenos e Óleos Essenciais

Um grande número de estudos têm sido feitos nos últimos anos na busca de atividade antifúngica de terpenóides de origem natural, principalmente sesquiterpenos e lactonas sesquiterpênicas. A fragrância de plantas está na fração de óleos essenciais. São encontrados dentre outros em plantas da família Rubiaceae. Estes óleos são metabólitos secundários, altamente enriquecidas em compostos à base de uma estrutura de isopreno, chamados terpenos, a sua estrutura química geral é $C_{10}H_{16}$. *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp., *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus niger* são grupos de fungos testados (YAMAGUCHI & VEIGA-JUNIOR, 2013).

2.3.9 Alcaloides

Compostos de nitrogênio heterocíclicos são chamados alcalóides. Encontrados principalmente na família Papaveracea. O primeiro exemplo clinicamente útil de um alcalóide foi a morfina; isolada em 1805 a partir da papoula de ópio *Papaver somniferum*, codeína e heroína são ambos derivados de morfina. Alcalóides diterpenóides, foram testados com atividade antimicrobial. Recentemente, um novo alcalóide, 2- (3,4-dimetil-2,5-di-hidro-1H-pirrol-2-il) - pentanoato de 1-metiletilo foi isolado a partir de planta *Datura metel* mostrou *in vitro*, bem como *in vivo* atividade contra espécies de *Aspergillus* e *Candida* (CRAGG & NEWMAN, 2014).

2.3.10 Naftoquinonas

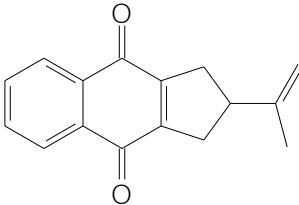
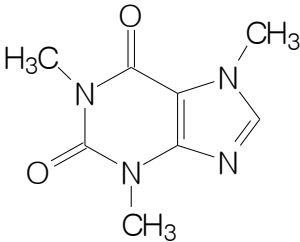
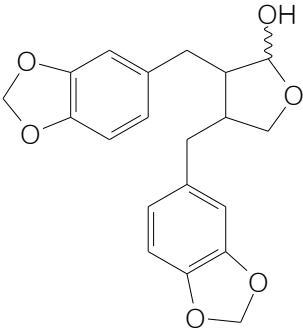
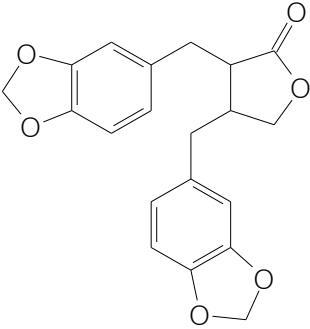
Naftoquinonas são pigmentos naturais que têm como característica estrutural, possuir dois grupos carbonila nas posições 1,4 e menos frequentemente em 1,2 ou 1,3 em anel de naftaleno, do qual deriva seu nome comum. Na natureza, com hidroxila e / ou metil como substituintes, além de estar em forma livre ou condensado com vários monossacarídeos. A distribuição naftoquinonas é ampla, e têm sido isolados a partir de plantas superiores em certas famílias de angiospermas como Ebenaceae, Droseraceae, Bignoniaceae, Verbenaceae, Leadwort, Juglandaceae, Boraginaceae, entre outros (WIDHALM & RHODES, 2016).

2.3.11 Amidas

A atividade antimicrobiana das amidas vem sendo estudada em mais de 1.000 espécies da família Piperaceae com ocorrência principalmente em regiões tropicais. A primeira substância isolada, a piperine data de 1819 e está além de outras tantas já isoladas têm demonstrado ao longo de pesquisa grande variedade de atividades biológicas. Em pesquisa realizada com folhas de *Piper scutilifolium* demonstrou-se que as amidas sem substituintes no anel aromático e com apenas uma ligação dupla foram ativas contra *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* enquanto N-N-diethyl e análogos demonstraram atividade dose dependente (MARQUES et al., 2010).

O Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais da Coordenação de Tecnologia e Inovação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (COTI/INPA) tem realizados estudos fitoquímicos de plantas da região amazônica. A líder do laboratório é a Dra. Maria da Paz Lima uma pesquisadora que nos últimos 10 anos tem investigado compostos isolados das famílias Bignoniaceae, Fabaceae e Linaceae. Esse laboratório participou do presente estudo cedendo 04 substâncias isoladas de plantas da região amazônica obtidas através de fracionamento do extrato metanólico (Tabela 3).

Tabela 3 – Substâncias naturais, estruturas e nomenclatura IUPAC das substâncias

Substâncias	Estruturas	Nomenclatura IUPAC
Dehydro-iso- α -lapachone		2-Isopropenyl-2,3-dihydronaphtho[2,3-b]furan-4,9-dione (mais usado) Dehydroiso-alpha-lapachone 2-prop-1-en-2-yl-2,3-dihydrobenzo[f][1]benzofuran-4,9-dione
Cafeína		1 <i>H</i> -Purine-2,6-dione, 3,7-dihydro-1,3,7-trimethyl
Cubebina		2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-3,4-Bis(1,3-benzodioxol-5-ylmethyl)tetrahydro-2-furanol (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-3,4-Bis(1,3-benzodioxol-5-ylmethyl)tetrahydro-2-furanol
Hinoquinina		1-(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-3,4-Bis(1,3-benzodioxol-5-ylmethyl)dihydrofuran-2(3 <i>H</i>)-one

2.4 Substâncias Antifúngicas de Origem Semi-Sintéticas

Os avanços na síntese química indicavam ser possível sintetizar em laboratório substâncias derivadas de plantas com interesse farmacêutico (SIMÕES et al., 2017). Inúmeros trabalhos mostram desde a década de 90, que a síntese de fármacos atinge cerca de 75% do total de fármacos utilizados no mundo e, ainda que se compararmos as estruturas dos medicamentos naturais e sintéticos, observa-se que 62% dos fármacos são derivados heterocíclicos. Destes 91% possuem pelo menos um átomo de nitrogênio, 25% um átomo de enxofre e muitos possuem mais de um heterátomo em suas estruturas (WERMUTH, 1992).

2.4.1 Compostos β -carbolínicos

Alcaloides do tipo β -carbolínicos também são conhecidos por alcaloides de *harmala*, esta denominação se deve ao fato de que as primeiras estruturas isoladas com este tipo de esqueleto foram obtidas a partir da espécie *Peganum harmala* (Zygophillaceae), planta tradicionalmente utilizada na medicina popular no Oriente Médio e Norte da África onde é utilizada para estimular a menstruação e abortos. Na China, extratos das sementes de *P. harmala* são utilizados no tratamento de diversas doenças, entre elas o câncer e a malária (CAO et al., 2007).

2.4.2 Carbazol

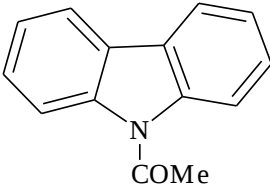
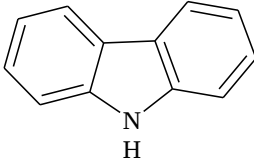
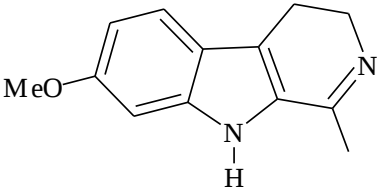
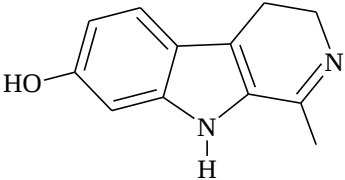
O carbazol, cujo nome sistemático é 9H-carbazol, (F.M = $C_{12}H_9N$ e P. M = 167, 20 g/mol., foi isolado pela primeira vez da casca do tronco da *Murraya koenigii* (Rutaceae). Planta originária da Índia e utilizada contra várias enfermidades, entre elas analgésico e febrífugo (NANDY et al., 2014).

A química do carbazol e seus derivados têm sido muito estudados nestas últimas décadas devido sua ampla aplicação, tanto em equipamentos eletrônicos para produção de materiais eletroluminescentes, além de corantes, semicondutores, etc. Também na parte farmacêutica, devido a seu potencial em diversas enfermidades, como antifúngica e antibactericida (ZHANG et al., 2010), anti-inflamatória e antitumoral (HSU et al., 2005).

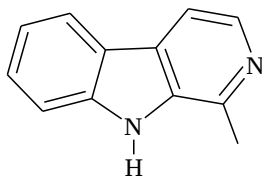
Sua estrutura eletrônica apresenta grande disponibilidade de elétrons caracterizada pela presença das ligações alternadas (MONTIOIA, 2013).

O Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia / LAPAAM da Coordenação de Tecnologia e Inovação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (COTI/INPA) tem realizados estudos de investigação de antimaláricos originados da floresta amazônica. A líder do laboratório é o Dr. Adrian Martin Pohlit, esse grupo de pesquisa isolou e investigou atividade antimalárica de substâncias nos últimos 15 anos. Esse laboratório participou do presente estudo cedendo 11 substâncias submetidas a processos de semisíntese, obtidas através de processo de nitração (Tabela 4).

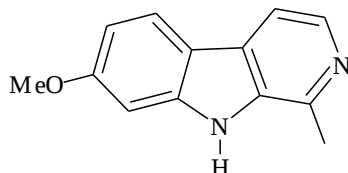
Tabela 4 – Substâncias semi-sintéticas, nomenclatura IUPAC e estruturas do carbazolol e dos compostos β -carbolina

Substâncias	Estruturas	Nomenclatura IUPAC
<i>N</i> -acetil-9 <i>H</i> -carbazol		<i>N</i> -acetil-carbazol
9 <i>H</i> -carbazol		9 <i>H</i> -carbazol
Harmalina		7-Metoxi-1-metill-4,9-dihydro-3 <i>H</i> -pyrido[3,4- <i>b</i>]indol
Harmalol		1-Metill-4,9-dihydro-3 <i>H</i> - β -carbolina-7-ol

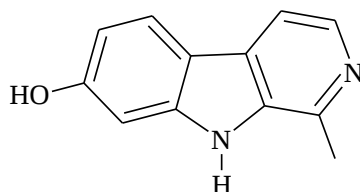
Harmano

1-Metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol

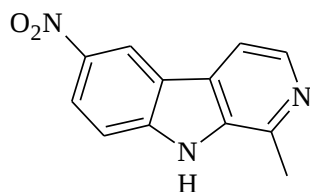
Harmina

7-Metoxi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol

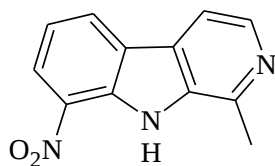
Harmol

1-Metil-2,9-dihydropirido[3,4-*b*]indol-7-one

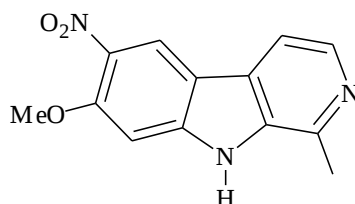
6-Nitroharmano

6-Nitro-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol

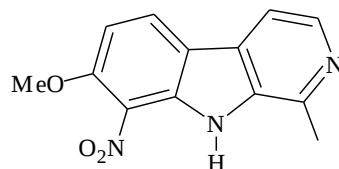
8-Nitroharmano

8-Nitro-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol

6-Nitroharmina

7-Metoxi-6-nitro-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol

8-Nitroharmina

7-Methoxi-8-nitro-1-meitil-9*H*-pyiido[3,4-*b*]indol

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- Investigar a atividade antifúngica de substâncias isoladas a partir de plantas da floresta amazônica e seus derivados químicos frente a organismos causadores de criptococose

3. 2 Específicos

- Investigar aspectos epidemiológicos, genótipos causadores e distribuição ambiental dos patógenos da criptococose no Amazonas por meio de revisão da literatura existente;
- Determinar entre as substâncias de plantas amazônicas testadas quais possuem atividade inibitória frente os agentes da criptococose e
- Investigar o mecanismo de ação e citotoxicidade das substâncias ativas testadas que exibiram melhor atividade inibitória frente aos agentes da criptococose.

4. APRESENTAÇÃO DOS CAPÍTULOS

Os materiais, metodologias, resultados e discussões dessa presente tese estão apresentados na forma de capítulos:

Capítulo 1 - Apresenta “**Criptococose no estado do Amazonas: aspectos epidemiológicos, genótipos causadores e distribuição ambiental dos patógenos**”. Esse capítulo está formatado na forma de artigo que será submetido a publicação no periódico no *Revista Iberoamericana de Micologia*;

Capítulo 2 - Apresenta “**Bioprospecção de substâncias semi-sintéticas derivadas de Harman e substâncias naturais isoladas de plantas para atividade contra *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii***”. Esse capítulo está formatado na forma de artigo que será submetido a publicação no periódico *International Journal of Microbiology* e

Capítulo 3 - Apresenta “**Mecanismo de ação antifúngico e a citotoxicidade das substâncias 2-prop-1-en-2-il-2,3-di-hidrobenzo [f [1] benzofurano-4,9-diona (desidro-iso- α -lapachona) e 8 nitro-1metil-9am-Pirido [3, 4b] indol (8 nitro harmano)**”. Esse capítulo está formatado na forma de artigo que será submetido a publicação no periódico *International Journal of Microbiology*.

5. CAPÍTULO 1

Criptococose no estado do Amazonas: aspectos epidemiológicos, genótipos causadores e distribuição ambiental dos patógenos

Katia Santana Cruz^{a,b}, Ani Beatriz Jackisch Matsuura^c, Diego Fernando Silva Rocha^d, Ana Cláudia Alves Cortez^d, Lizandra Stephanny Fernandes Menescal^e, Lucilaide de Oliveira Santos^b, Clarissa Santana Cruz^f, João Vicente Braga de Souza^d.

Resumo

A criptococose é uma infecção fúngica de distribuição mundial causada pelo gênero *Cryptococcus*. O objetivo foi investigar aspectos epidemiológicos, genótipos causadores e distribuição ambiental dos patógenos da criptococose no Amazonas por meio de revisão da literatura existente. Na Amazônia é uma doença que acomete em média 25 pessoas anualmente sendo essas principalmente homens (73%), jovens (39,2±12,3, 19-68 %), portadores de HIV (70-85 %). A região também apresenta em torno de 3 casos/ano de criptococose em paciente sem imunocomprometimento aparente, incluindo 1-2 casos de crianças. As principais formas clínicas da doença na região são a neurocriptococose (96%) e fungemia (42%). Quanto ao diagnóstico laboratorial, a Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado, centro de referência em infectologia da região Norte, centraliza a maior parte dos diagnósticos. Os exames direto e cultura de líquido cefalorraquidiano são a forma mais comum de diagnóstico. A pesquisa com Cryptococcal Antigen Lateral Flow Assay em amostras de sangue tem sido utilizada e destaca-se por sua sensibilidade e velocidade de execução, principalmente útil quando o paciente apresenta baixa carga fúngica (estágios iniciais da doença). Quanto aos agentes, os genótipos do complexo *Cryptococcus neoformans* são principais agentes causadores da doença (86%), sendo que, os principais genótipos causadores na região são VNI (86%) e VGII (14%) e o principal MLST é ST93 (86%). Por fim, quanto a distribuição ambiental o genótipo de *C. gattii* VGII apresentou alta variabilidade genética ST20, ST46, ST444 e um novo genótipo ST453.

Palavras chave: Criptococose, Amazonas, *Cryptococcus*.

Introdução

A criptococose é uma infecção fúngica sistêmica, causada por levedura encapsulada do gênero *Cryptococcus*. A fonte de infecção é exógena e entrada primária do organismo é através dos pulmões. As manifestações clínicas variam da colonização pulmonar assintomática à disseminação em qualquer lugar no corpo. A meningoencefalite é a principal manifestação clínica produzida por este patógeno e uma causa primária de alta mortalidade (Negroni, 2012).

Esta micose corre em todo o mundo, porém suas manifestações clínicas são frequentemente observadas na África e Américas (Negroni, 2012). É a terceira micose sistêmica mais prevalente dentre os pacientes portadores do vírus da imunossupressão humana, e este aumento está diretamente ligado ao aumento do número de pacientes com a AIDS (Spec e Powderly, 2018).

Desde os primeiros casos de criptococose descritos no Brasil por Lacaz e Almeida (Lacaz e Rodrigues, 1983) respectivamente em 1941 e 1944, essa doença, detectada anteriormente em pacientes submetidos a transplantes, a tratamentos específicos com glicocorticoides, ou com doenças de base como sarcoidose, portadores de tumores sólidos, ou deficiências do sistema imune (Pappalardo e Melhem, 2003) sofreu uma substancial modificação em sua ocorrência em nosso país, fato que culminou com o aparecimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) na década de 1980 (Mitchell e Perfect, 1995).

No Amazonas, segundo o Boletim Epidemiológico HIV/AIDS 2018 do Ministério da Saúde, de 2007 a 2018 foram notificados 6.508 casos de pessoas portando do vírus HIV, ocupando 5º no ranking dentre os estados da federação, de detecção de novos casos da doença ao ano (Saúde, 2018).

Estudos clínicos epidemiológicos e ambientais têm sido realizados por pesquisadores do estado do Amazonas, demonstrando a ascensão dessa doença grave, de prognóstico letal. Este trabalho tem por finalidade apresentar os dados epidemiológicos, visando o conhecimento da real situação dessa doença não notificável que necessita de um esforço em nível mundial para seu melhor controle, assim como objetiva o compartilhamento de conhecimentos para formação de massa crítica capaz de contribuir com a melhoria no manejo, diagnóstico e tratamento da criptococose no Amazonas.

A Criptococose no Amazonas Hoje e no Passado

O estado do Amazonas é o maior dos estados brasileiros, possui área de 1.559.159,148 km², sendo esta área maior que França, Espanha Suécia e Grécia somadas. Manaus, sua maior cidade concentra 50% de toda a população do estado, 2,1 milhões de pessoas (IBGE, 2016). A estrutura de saúde da capital é organizada em hospitais de atendimento, divididos por especialidades. Existe um hospital especializado em doenças infecciosas e parasitárias, Hospital de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD). Este hospital funciona como referência para tratamento de pacientes portadores da Síndrome da Imunodeficiência Humana (SIDA). Realiza atendimento médico e laboratorial mensal a cerca de 5000 pacientes.

Segundo dados do Laboratório de Micologia da FMT-HVD, entre janeiro de 2013 e setembro de 2018, o número de casos de criptococose foi de 136 casos (média de 23 casos ao ano), sendo 107 (78,7 %) dos casos de *Cryptococcus neoformans* e 29 (21,3 %) dos casos de *Cryptococcus gattii*, diagnosticados respectivamente nos materiais biológicos, líquido cefalorraquidiano (LCR), sangue (Hemocultura) e escarro.

Estudo anterior realizado por Cruz (2004) entre os anos de 2000 e 2002, descreveu 24 casos de criptococose (média de 08 casos ao ano), dentre 170 casos de micoses diagnosticados em pacientes portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana na FMT-HVD, correspondendo a 18,2% das micoses em pacientes detectadas.

Aspectos clínicos epidemiológicos analisados no ano de 2000 por Santos (2000), através de estudo de 75 cepas clínicas isoladas no Laboratório de Micologia da FMT-HVD entre os anos de 1988-1998, apresentou como principal constatação a frequência da criptococose infantil que representou uma significativa fração dentre os casos reportados (33%, n=75), sendo o *C. gattii* como agente de meningite em crianças de 0-15 anos não portadoras de HIV.

Em seus estudos laboratoriais, Silva (2009) realizou a caracterização em 40 cepas clínicas isoladas, no período de (2006 a 2008), evidenciando que os pacientes mais afetados pela criptococose eram do sexo masculino, jovens (16-30 anos), HIV-positivos e os habitantes da zona leste da cidade de Manaus. *C. neoformans* foi à espécie mais frequentemente isolada (n = 31; 77,5%), quase que exclusivamente em pacientes imunocomprometidos, sendo que a maioria dos isolados obtidos foi de pacientes com AIDS. Entre os nove isolados de *C. gattii*, três foram obtidos de pacientes

imunocompetentes, quatro de pacientes com AIDS e dois pacientes sem caracterização quanto ao estado imunológico.

Em 2012, Freire *et al.*, realizou estudos em 60 cepas clínicas isoladas deste mesmo laboratório, no período de 2006 a 2010, sendo dessas quarenta cepas (66,7%) caracterizadas como *C. neoformans*, dezessete (28,3%) de *C. gattii* e apenas três (5%) dos isolados não puderam ser caracterizados por nenhum dos protocolos estudados.

Segundo Rocha *et al.* (2018), no Amazonas os casos de meningite criptocócica como infecção oportunista em indivíduos com AIDS tem sido diagnosticados desde 1986 conforme dados epidemiológicos da FMT-HVD. Em um período de 23 anos (1990-2012) a prevalência dessa infecção foi de 0,8% dentre as demais causas de meningite, com um aumento significativo de casos no ano de 2008 (Gomes *et al.*, 2015). A criptococose também foi descrita como a sexta causa de óbito em pacientes com AIDS necropsiados na mesma unidade no período de 1996 a 2003 (Souza *et al.*, 2008).

Em um minucioso estudo clínico laboratorial Rocha *et al.* (2018) descreveu os aspectos clínicos laboratoriais em 30 pacientes internados entre fevereiro de 2014 a maio de 2016 na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado FMT-HVD, revelando que a maioria dos pacientes era do sexo masculino (19; 73%), e a média de idade foi de $39,8 \pm 12,2$ com uma variação de 19-68 anos. A infecção pelo HIV foi relatada em 26 pacientes (87%), sendo que 17 (74%) apresentavam CD4 + contagem de células T abaixo de 50 mm³/ml, sendo todos afetados apenas por *C. neoformans*.

Quanto a neurocriptococose, Rocha *et al.* (2018) mostra a apresentação clínica mais frequente (29; 97%) e, destes casos, 10 (34%) também estiveram associadas à infecção sanguínea; apenas um paciente com HIV apresentava apenas fungemia. Os sinais e sintomas iniciais mais comuns foram cefaléia (28; 93%), febre (21; 70%), perda de peso (17; 57%), desorientação (14; 47%) e comprometimento Visual (11; 37%). Quatro (13%) pacientes também utilizaram sistemas de derivação líquórica para superação da hipertensão intracraniana. Sequelas neurológicas, como diminuição da acuidade visual (10; 33%), déficit auditivo (4; 13%), déficit motor (3; 10%), hidrocefalia (3; 10%) e hiposmia (2; 7%), foram mais frequentes na população do HIV.

Genótipos Regionais

Os estudos que tipificam microrganismos patogênicos são importantes para conhecer os principais agentes, sua distribuição ambiental, interação com o hospedeiro e

evolução terapêutica. A evolução da biologia molecular, em especial a reação de cadeia de polimerase (PCR), vem permitindo, de forma cada vez mais acessível, tipificar os organismos patogênicos (Litvintseva *et al.*, 2015). Entre as ferramentas utilizadas na genotipagem dos agentes da criptococose, destaca-se a PCR-fingerprint e o MLST. Vamos discutir a aplicação dessas tecnologias nos agentes da criptococose.

As primeiras reações de tipificação dos agentes causadores da criptococose foram imunológicas do tipo antígeno-anticorpo (Evans, 1950). Os agentes da criptococose tiveram uma classificação clássica baseada na presença de antígenos presentes na parede celular da levedura. A classificação dos quatro sorotipos: A, B, C, D e AD.

O marco da utilização dos métodos baseados na PCR para a caracterização dos microrganismos ocorreu em 1999, isso devido a um surto de criptococose causado por *C. gattii* na ilha de Vancouver, Colúmbia Britânica, Canadá (Byrnes *et al.*, 2009). Antes desse surto acreditava-se que *C. gattii* era restrito às áreas tropicais e, portanto, houve um esforço acadêmico em classificar os agentes patogênicos e entender a sua distribuição ambiental. A PCR-fingerprint descrita por Meyer *et al.*, (1993) foi a metodologia mais utilizada nesses ensaios. A metodologia consiste em uma PCR utilizando-se um primer como único iniciador específico para o DNA de minissatélites ou microssatélites. Os mesmos autores também descreveram uma reação de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) para o gene URA5. Ambas metodologias se tornaram bem conhecidas e foram aplicadas ao redor do mundo para determinação dos genótipos clínicos e ambientais associados a criptococose.

Na Amazônia, o primeiro trabalho realizado para identificação de genótipos na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTM) foi realizado por Silva (2009) para caracterizar 40 isolados obtidos clínicos de *Cryptococcus*, no período de 2006-2008. Através de metodologias de fenotipagem (características bioquímicas, produção de enzimas e de biologia molecular (URA5-RFLP). Trinta e um (75,5%) dos isolados clínicos foram classificados como *C. neoformans* e 9 (22,5%) como *C. gattii*. Altos níveis de proteases e fosfolipases foram produzidos pela maioria dos isolados. Utilizando o teste de difusão em disco (CLSI M44-A), 81, 35 e 100% dos isolados de *C. neoformans* foram caracterizados como susceptíveis ao fluconazol, itraconazol e anfotericina B respectivamente, enquanto que 78, 56 e 100% dos isolados de *C. gattii* foram sensíveis a esses antimicrobianos. A média de concentração inibitória mínima (CIM) para *C. neoformans* e *C. gattii* isolados foi de 0,26 e 0,58 µ/ml, respectivamente. Nove isolados de *C. gattii* demonstraram um padrão de eletroforese compatível com o tipo molecular

VGII e todos os 31 isolados de *C. neoformans* apresentaram um padrão compatível com o tipo VNI. Demonstrando a importância do HIV/SIDA para a epidemiologia da criptococose, a susceptibilidade dos isolados a anfotericina B e alta prevalência dos genótipos molecular VNI e VGII no norte do Brasil.

Em trabalho realizado por Freire *et al.* (2012), foram analisadas 40 cepas clínicas através das técnicas de PCR-Fingerprinting e PCR-RFLP URA-5 para demonstrar a presença dos grupos moleculares VNI, VNII e VGII. Estratificando os grupos moleculares incluídos em sua respectiva espécie, tem-se que do total de 40 isolados de *C. neoformans*, 39 (39/40; 97,5%) pertenceu ao grupo molecular VNI e 1 (1/40; 2,5%) do VNII; e todos os 17 isolados da espécie *C. gattii* foram identificados no grupo molecular VGII (17/17; 100%). Sendo esse o primeiro relato de existência de *C. neoformans* do grupo molecular VNII na região Norte do Brasil.

Quadro 1 – Classificações por sorotipo, PCR-fingerprint dos agentes causadores de criptococose e MLST dos genótipos regionais

Patógeno	Sorotipo	Genótipos (fingerprint)	Genótipos do estado do Amazonas MLST
<i>Cryptococcus neoformans</i>	A	VNI, VNB e VNII	ST93
	D	VNIV	
	AD	VNIII	
<i>Cryptococcus gattii</i>	B	VGI, VGII, VGIII e	ST172, ST5, ST445 e ST20
	C	VGIV	

O MLST para genotipagem de agentes causadores da criptococose surge com a finalidade de aumentar a capacidade de distinção entre os genótipos. A MLST é uma técnica de biologia molecular para a tipificação de loci múltiplos. O procedimento caracteriza isolados de espécies microbianas usando as sequências de DNA de fragmentos internos de múltiplos genes denominados “housekeeping genes”. Aproximadamente 450-500 pb de fragmentos internos de cada gene são usados, pois estes podem ser sequenciados com precisão em ambas as fitas usando um sequenciador automático de DNA. As diferentes sequências presentes dentro de uma espécie são atribuídas como alelos distintos e, para cada isolado, os alelos em cada um dos loci definem o perfil alélico ou o tipo de sequência (ST) (Byrnes *et al.*, 2010; Brito-santos *et al.*, 2015; Firacative *et al.*, 2016).

Rocha *et al.* (2018) investigou o MLST de isolados clínicos do estado do Amazonas e concluiu que a criptococose por *C. neoformans* é causada exclusivamente

pelo genótipo ST93, por outro lado, os isolados de *C. gattii* são extremamente variáveis incluindo os ST172, ST5, ST445 e ST20. Este último (ST20) corresponde ao tipo molecular VGIIa, considerado o mais virulento da espécie *C. gattii* e já foi encontrado na Austrália, EUA, Canadá e Brasil. De uma forma geral, os estudos de ancestralidades realizados com os ST's tem demonstrado os estados do Norte e Nordeste do Brasil como ambiente de surgimento da espécie *C. gattii* VGII (Firacative *et al.*, 2016).

Estudos Quanto as Fontes Ambientais no Amazonas

No Amazonas, em estudos de fontes de infecção de *Cryptococcus* e variabilidade genética de cepas de origem ambiental foi verificado que *Cryptococcus neoformans* tipo molecular VNI apresenta ampla distribuição na cidade de Manaus, sendo encontrado nas seis zonas da cidade em fezes de pombo. *C. gattii* tipo molecular VGII foi encontrado em oco de árvore (*Moquilea tomentosa*). A taxa de positividade observada nas amostras estudadas foi de 4,8% (12/251) para fezes de pombos e aves em cativeiro e 0,4% (1/255) para ocos de árvores (Alves *et al.*, 2016). *C. gattii* VGII também foi encontrado na água do Rio Negro (Byrnes *et al.*, 2010).

Estudos da poeira domiciliar em áreas rurais no Amazonas também apontaram a presença de *C. neoformans* VNI e *C. gattii* VGII. Estudos com esse tipo de amostra tem evidenciado um risco de pacientes com AIDS adquirir criptococose na sua própria residência (Swinne *et al.*, 1989; Passoni *et al.*, 1998).

No município de Iranduba/AM, região metropolitana de Manaus e que fica localizada entre o Rio Negro e Rio Solimões, foi estudada a poeira domiciliar das casas da comunidade e verificada a presença das duas espécies, em algumas foram isoladas ao mesmo tempo na mesma casa (12 casas positivas/3 mistas). O genótipo de *C. gattii* VGII dessas amostras foi bastante variável, sendo encontrado o ST20, ST46, ST444 e 1 novo genótipo ST453. As amostras de *C. neoformans* VNI, ao contrário, não apresentaram variabilidade sendo todas as amostras do genótipo ST 93 (Alves *et al.*, 2016). Essa variabilidade genética de *C. gattii* foi observada em outra localidade no Amazonas, Santa Isabel do Rio Negro, que fica a 620 km de Manaus. Nessa localidade também foi feito um estudo da poeira domiciliar. Houve positividade em 3 de 51 das casas estudadas. A espécie isolada foi *C. gattii* VGII apresentando alta variabilidade. Os genótipos encontrados foram ST5, ST7, ST20 e 5 novos genótipos (ST264, ST265, ST266, ST267 e ST268) (Brito-Santos *et al.*, 2015).

Quando comparamos as amostras ambientais de *Cryptococcus* com as amostras clínicas causadoras de criptococose em pessoas no Amazonas observamos a concordância entre as espécies, tipos moleculares e vários genótipos. Porém as cepas de *C. neoformans* não foi observada variabilidade, tanto as amostras clínicas quanto as amostras ambientais todas têm o genótipo ST93, se diferenciando totalmente de *C. gattii* que apresentou alta variabilidade genética e com o destaque do ST20.

Quadro 2 – Classificações por PCR-fingerprint dos agentes causadores de criptococose e MLST dos genótipos regionais no meio ambiente

Patógeno	Tipos moleculares encontrados no ambiente	Genótipos de meio ambiente do estado do Amazonas MLST
<i>Cryptococcus neoformans</i>	VNI	ST93 ^a
<i>Cryptococcus gattii</i>	VGII	ST5 ^b , ST7 ^b , ST20 ^{a,b} , ST46 ^a , ST264 ^b , ST265 ^b , ST266 ^b , ST267 ^b , ST268 ^b , ST444 ^a , ST453 ^a

^a = Alves *et al.* (2016)

^b = Brito-Santos *et al.* (2015)

Diante do exposto, entende-se que os estudos de genotipagem são importantes para conhecer os principais agentes, sua distribuição ambiental, interação com o hospedeiro e evolução terapêutica. No Estado do Amazonas, ao longo dos últimos 10 anos, tem sido realizado um esforço de genotipagem dos agentes causadores da criptococose. Os trabalhos realizados já nos permitem concluir que:

- a) Os principais genótipos regionais são VNI e VGII;
- b) VNI o principal agente da doença em pacientes HIV/AIDS e VGII o principal agente nos pacientes sem imunocomprometimento aparente e
- c) As infecções por *C. neoformans* VNI são causadas pelo ST 93 e as infecções por *C. gattii* são causadas por uma grande diversidade de ST's incluindo, ST172, ST5, ST445 e ST20.

Agradecimentos

A todos profissionais envolvidos no diagnóstico, tratamento e aos pacientes que ao longo desses 30 anos nos permitiram desenvolver esse trabalho.

REFERÊNCIAS

- Alves, G.S.B., Freire, A.K.L., Bentes, A.D.S., Pinheiro, J.F.D.S., de Souza, J.V.B., Wanke, B., Matsuura, T., Jackisch-Matsuura, A.B., 2016. Molecular typing of environmental *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complex isolates from Manaus, Amazonas, Brazil. *Mycoses*, 59, 509–515. <https://doi.org/10.1111/myc.12499>
- Brito-Santos, F., Barbosa, G.G., Trilles, L., 2015. Environmental Isolation of *Cryptococcus gattii* VGII from Indoor Dust from Typical Wooden Houses in the Deep Amazonas of the Rio Negro Basin. *PLoS One*, 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115866>
- Byrnes, E.J., Bildfell, R.J., Frank, S.A, Mitchell, T.G., Marr, K.A, Heitman, J., 2009. Molecular evidence that the range of the Vancouver Island outbreak of *Cryptococcus gattii* infection has expanded into the Pacific Northwest in the United States. *J. Infect. Dis.* 199, 1081–6. <https://doi.org/10.1086/597306>
- Byrnes, E.J., Li, W., Lewit, Y., Ma, H., Voelz, K., Ren, P., Carter, D. A, Chaturvedi, V., Bildfell, R.J., May, R.C., Heitman, J., 2010. Emergence and pathogenicity of highly virulent *Cryptococcus gattii* genotypes in the northwest United States. *PLoS Pathog.* 6, e1000850. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000850>
- Cruz, K.S., 2004. Prevalência de agentes de micoses em pacientes portadores do vírus HIV atendidos na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMTAM. Universidade do Estado do Amazonas.
- Evans, E.E., 1950. The Antigenic Composition of *Cryptococcus neoformans*. I. A Serologic Classification by means of the Capsular and Agglutination Reactions. *J. Immunol.* 64, 423–30.
- Firacative, C., Roe, C.C., Malik, R., Ferreira-paim, K., Escandón, P., Sykes, J.E., Rocío, L., Contreras-peres, C., Samayoa, B., Sorrell, T.C., Casta, E., Lockhart, S.R., Engelthaler, D.M., Meyer, W., 2016. MLST and Whole-Genome-Based Population Analysis of *Cryptococcus gattii* VGIII Links Clinical, Veterinary and Environmental Strains, and Reveals Divergent Serotype Specific Sub-populations and Distant Ancestors. *PLoS Negl Trop Dis.* 10, 8, 1–31. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004861>
- Freire, A.K., Bentes, A.S., Sampaio, I.L., Matsuura, A.B., Ogusku, M.M., Salem, J.I., Wanke, B., Souza, J.V.B. (2012) Molecular characterization of the causative agents of Cryptococcosis in patients of a tertiary healthcare facility in the state of Amazonas-Brazil. *Mycoses*, 55, 145–150.
- Gomes, G., Cristianne, E., Santos, S., Saraceni, V., Laura, L., Monte, R.L., Albuquerque, B.C. De, Bastos, M.D.S., Cordeiro, M., Monteiro, W.M., Paula, M., Mourão, G., Vinitius, M., Guerra, D.F., Vinícius, M., Lacerda, G. De, 2015. Epidemiology of infectious meningitis in the State of Amazonas, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 48, 79–86.
- IBGE. Síntese de indicadores sociais: uma análise das condições de vida da população brasileira: 2016 / IBGE, Coordenação de População e Indicadores Sociais. - Rio de

- Janeiro: IBGE, 2016.
2016. Pesquisa nacional por amostras de domicílios.
- Lacaz, C.S., Rodrigues, M., 1983. Sorotipagem do *Cryptococcus neoformans*. Rev. Bras. Med. Trop. 40, 297–300.
- Litvintseva, A.P., Brandt, M.E., Mody, R.K., Lockhart, S.R., 2015. Investigating Fungal Outbreaks in the 21st Century. PLoS Pathog, 11, 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004804>
- Mitchell, T.G., Perfect, J.R., 1995. Cryptococcosis in the Era of AIDS — 100 Years after the Discovery of *Cryptococcus neoformans*. Clin Microbiol Rev, 8, 515–548.
- Negroni, R., 2012. Cryptococcosis. Clin. Dermatol. 30, 599–609. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2012.01.005>
- Pappalardo, M.C.S.M., Melhem, M.S.C., 2003. Cryptococcosis : a review of the brazilian experience for the disease. 45, 299–305.
- Passoni, L.F., Wanke, B., Nishikawa, M.M, Lazéra, M. S., 1998. *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: An analysis of domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis. J Med Vet Mycol, 36, 305–311.
- Rocha, D.F.S., Cruz, K.S., Santos, C.S.S., Menescal, L.S.F., Silva Neto, J.R., Pinheiro, S.B., Silva, L.M., Trilles, L., Souza, J.V.B. 2018. MLST reveals a clonal population structure for *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI isolates from clinical sources in Amazonas, Northern-Brazil. Plos One, 13, 1-15.
- Santos, L., 2000. Criptococose no estado do Amazonas: estudo de 75 casos diagnosticados na Fundação de Medicina Tropical/FMT/IMTM, Manaus, AM (1988-1998). Msc Thesis, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, 154 pp.
- Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico-Hiv aids 2018, 49, 2018.
- Silva, B., 2009. Caracterização de isolados clínicos do complexo *Cryptococcus neoformans*-*C. gattii* do estado do Amazonas-Brasil. Universidade do Estado do Amazonas.
- Souza, S.L.S. De, Feitoza, P.V.S., Araujo, J.R. De, Andrade, R.V. De, Ferreira, 2008. Causes of death among patients with acquired immunodeficiency syndrome autopsied at the Tropical Medicine Foundation of Amazonas. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 41, 247–251.
- Spec, A., Powderly, W.G., 2018. Cryptococcal meningitis in AIDS, 1st ed, The Neurology of HIV Infection. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63849-6.00011-6>
- Swinne, D., Deppner, M., Laroche, R., Floch, J.J., K.P., 1989. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from houses of AIDS-associated cryptococcosis patients in Bujumbura (Burundi). AIDS 3, 389–390.
- Meyer, W., Mitchell, T. G., Freedman, E.Z., and R.V., 1993. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. J. Clin. Microbiol. 31, 2274–2280.

6. CAPÍTULO 2

Bioprospecção de substâncias semi-sintéticas derivadas de Harman e substâncias naturais isoladas de plantas para atividade contra *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*.

Kátia Santana Cruz^{1,2,3}, Erica Simplício de Souza⁴, Ana Cláudia Alves Cortez⁵, Maria da Paz Lima⁵, Loretta Ennes de Carvalho⁵, Andréia Montoia², Adrian Martin Pohlitz⁵, João Vicente Braga de Souza^{5*}

Resumo

Introdução: A criptococose é uma doença fúngica grave e de difícil prognóstico, desde a patogenicidade de seus agentes etiológicos e as limitações quanto ao tratamento. O objetivo deste estudo foi de avaliar a atividade antifúngica de substâncias naturais e/ou semi-sintéticas extraídas de plantas da floresta amazônica frente aos agentes da criptococose.

Métodos: A determinação das concentrações inibitórias mínimas foram das 15 substâncias avaliadas foram realizadas de acordo com as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute para as substâncias frente aos quatro genótipos de *C. neoformans* e *C. gattii*.

Resultado: *Screening* de 15 compostos destacou que a substância desidro-iso- α -lapachona (NAF2) apresentou CIM de 80 $\mu\text{g/mL}$ frente *C. neoformans* VNI, VNII e VNIII e frente a *C. gattii* VGI e VGIII, CIM de 160 $\mu\text{g/mL}$ frente a *C. neoformans* VNIV e *C. gattii* VGII e VGIV. A substância 8 nitroharmano (AHON1) apresentou CIM de 40 $\mu\text{g/mL}$ frente *C. neoformans* VNI, VNII, VNIII e frente a *C. gattii* VGII e VGIII, CIM de 80 $\mu\text{g/mL}$ frente *C. neoformans* VNII e frente a *C. gattii* VGI e CIM de 160 $\mu\text{g/mL}$ frente a *C. gattii* VGIV.

Conclusão: Foram identificadas duas substâncias que inibiram significativamente as espécies patogênicas da criptococose, sendo interessante para pesquisa como potencial composto para a terapia das infecções por agentes da criptococose.

Keywords: bioensaio antifúngico, plantas amazônicas, *Cryptococcus*

1. Introdução

A criptococose, uma doença fúngica causada por *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*, ocorre predominantemente em indivíduos imunocomprometidos. As infecções por *Cryptococcus* ocorrem através da inalação de blastosporos e basidiósporos que estabelecem uma infecção pulmonar. Essas infecções também podem se disseminar para as meninges e para o cérebro, causando meningite ou meningoencefalite.

Para o tratamento da criptococose, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda um curso de duas semanas com anfotericina B e fluocitosina (5-FC) como fase inicial de indução intensiva e posteriormente sendo substituído para fluconazol nas fases de consolidação e monitoramento do tratamento para meningite criptocócica (Perfect *et al.*, 2010).

O arsenal de opções de tratamento disponíveis atualmente para o manejo é limitado, sem nenhuma nova classe de agente antifúngico exibindo atividade criptocócica licenciada em quase 30 anos (Niemirowicz *et al.*, 2017). A falha do tratamento e a toxicidade do medicamento são frequentemente observadas e a busca por possíveis drogas para terapia é necessária (O'Halloran *et al.*, 2017).

A abordagem moderna de desenvolvimento de medicamentos para doenças mais complexas, sobretudo as doenças endêmicas negligenciadas, como criptococose, está baseada no uso de moléculas com novos alvos moleculares. Produtos naturais continuam a ser uma fonte rica de agentes farmacológicos na luta contra doenças que vem se alastrando principalmente em países em desenvolvimento. Tradicionalmente, os produtos naturais e seus derivados são utilizados como a fonte mais comum na busca de fármacos, e ainda representam mais de 30% dos produtos farmacêuticos atuais (Phipps e Grundmann, 2017).

Sabe-se que as estruturas dos produtos naturais possuem características de alta diversidade química, especificidade bioquímica e outras propriedades moleculares que fazem delas, estruturas favoráveis como compostos líderes para a descoberta de novos fármacos, e servem para diferenciá-las das de bibliotecas de componentes sintéticos e combinatórias (Arif *et al.*, 2009).

No Brasil a *Banisteriopsis caapi* da família Malpighiaceae, conhecida popularmente como jagube, mariri, yagé, mariri ou caapi, nativa da Amazônia e dos Andes, sendo um constituinte da ayahuasca, é usada tradicionalmente como bebida

alucinogénica, ingerida em rituais pelas tribos amazônicas e da América do Sul (Cruz *et al.*, 2013). Dela são isoladas substâncias como o harmano que pertence a uma classe dos alcalóides β -carbonilos que através de processos de Nitração, fornece o 8 nitroharmano.

Trabalhos anteriores mostraram que os alcalóides harmanos e as β -carbólinas relacionadas (β Cs) exibem importantes propriedades antifúngicas. Harmol é fungicida para *Botrytis cinerea* e fungistática para *Penicillium digitatum* afetando a permeabilização de membranas de conídios em ambas as espécies (Herraiz *et al.*, 2010). Harmano inibiu seletivamente *Cercospora arachidicola* enquanto seu derivado semisintético 8-nitroharmano inibiu fortemente 13 de 14 espécies de fungos testados (Song *et al.*, 2014). Uma variedade de análogos sintéticos β C foram recentemente patenteados como fungicidas para o tratamento de doenças de plantas (Segal Joseph, 2016).

De relevância medicinal, harmano (Vrm Reza, 2007) e harmina (Nenaah, 2010) são relatados como potentes inibidores de *Candida albicans* e harmina em combinações binárias com outros β Cs que inibem fortemente *Aspergillus niger*. Harmalina inibe significativamente a lipase de *Candida rugosa in vitro* como inibidor competitivo de acordo com estudos *in silico* (Benarous *et al.*, 2015).

Uma patente recente descreve o aumento, pelo cloridrato de harmina, da ação do fluconazol contra *C. albicans* resistente a drogas em composições que alegam reverter a resistência ao fluconazol (Li e Hao, 2017). Estes e outros exemplos atestam o potencial de harmanos de origem natural ou sintética como agentes antifúngicos para aplicações medicinais e outras.

A *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson (Bignoniaceae), no Brasil, possui ocorrência, da Amazônia ao Nordeste até São Paulo, sendo comum em florestas pluviais densas, florestas secundárias e campinas. É popularmente conhecida como ipê, ipê-amarelo, ipê-do cerrado, ipê-ovo-de-macuco, ipê-pardo, ipê-tabaco, pau-d'arco, pau-d'arco-amarelo, pau-d'arco-da-flor-amarela, piúva-amarela e tamurá-tuíra e apresenta 20 sinonímias botânicas (Tropicos, 2016).

A substância desidro-iso- α -lapachona, pertencente a classe das naftoquinonas pode ser extraída desta planta através de fracionamento de extrato metanoico. Tem uso medicinal popular no tratamento de cancro, doenças renais, hepáticas e intestinais (Barcelos *et al.*, 2017). Também tem relato na literatura como anticancerígeno e anti-inflamatório (Epifano e Genovese, 2014). Em outro estudo, foi observada a influência da adição de molécula hidrofóbica no anel benzênico em frações de 1-4 naftoquinona e a 1,4

antracedinona e sua atividade antifúngica contra *Candida* spp., *Aspergillus* spp., dermatofitos e *Fusarium oxysporum* pode se concluir ação fungistática dos compostos (Leyva *et al.*, 2017). A 5-hydroxy-2-methyl-1,4-naftoquinona foi testada com ação antifúngica na formação de biofilme por *Candida albicans* em cateteres (Sweatha *et al.*, 2016). Naftoquinonas sintéticas mostraram boa atividade antifúngica e seu mecanismo de ação foi avaliado frente a cepas de fungos das classes dos dermatofitos e oportunista (Ferreira *et al.*, 2014).

Até onde sabemos, os alcalóides harmanos ou seus derivados e desidro-iso- α -lapachona não foram testados contra *Cryptococcus* spp. O objetivo deste estudo foi de avaliar a atividade antifúngica de substâncias naturais e/ou semisintéticas extraídas de plantas da floresta amazônica frente aos agentes da criptococose.

2. Material e Métodos

Obtenção das substâncias

Quatro substâncias isoladas de plantas da região amazônica obtidas através de fracionamento do extrato metanólico foram cedidas para o presente estudo pela Dra. Maria da Paz Lima, pesquisadora e chefe do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais da Coordenação de Tecnologia e Inovação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (COTI/INPA), que desenvolve pesquisas a 10 anos com estudos fitoquímicos de plantas da região amazônica das famílias Bignoniaceae, Fabaceae e Linaceae. A tabela 1 apresenta algumas das substâncias a) código da substância, b) estrutura química, c) nomenclatura IUPAC e d) origem da substância.

As 11 substâncias semi-sintéticas isoladas de plantas da região amazônica, foram cedidas pelo Dr. Adrian Martin Pohlit, pesquisador e líder do Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia / LAPAAM da Coordenação de Tecnologia e Inovação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (COTI/INPA), tem realizados estudos de investigação de antimaláricos originados da floresta amazônica, o qual isolou e investigou atividade aproximadamente substâncias nos últimos 15 anos. A tabela 2 apresenta algumas destas substâncias obtidas através de processo de nitração: a) código da substância, b) nome IUPAC, c) estrutura química e d) origem da substância (Tabela 2).

Tabela 1 - Código da substância naturais, nomenclatura IUPAC, estrutura química e origem da substância

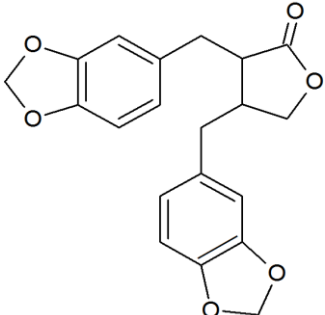
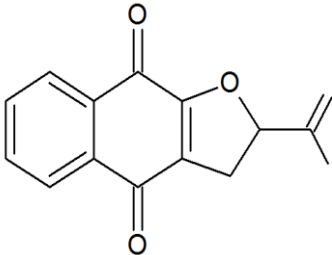
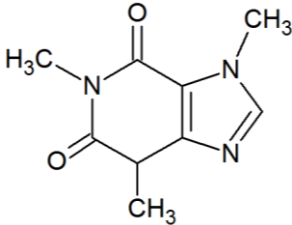
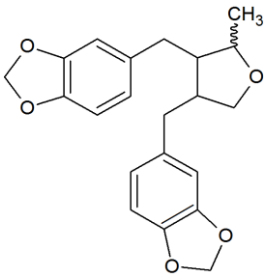
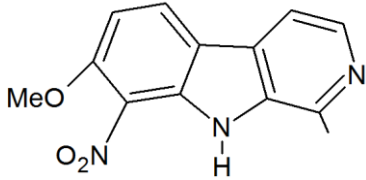
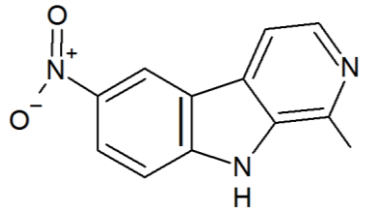
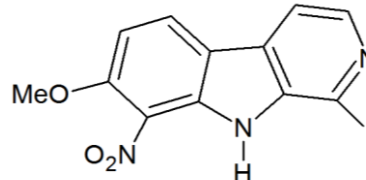
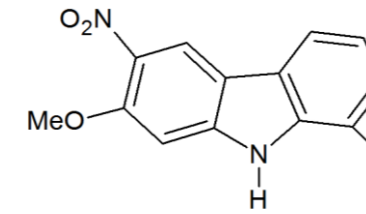
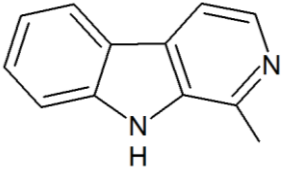
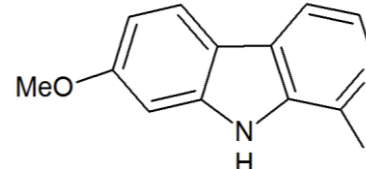
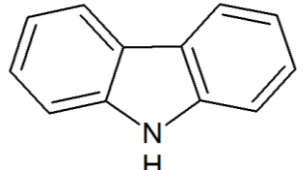
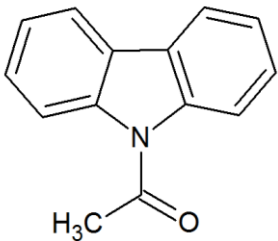
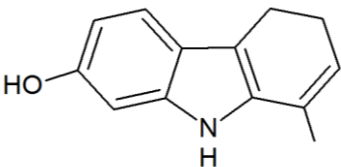
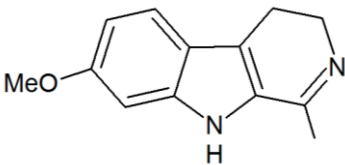
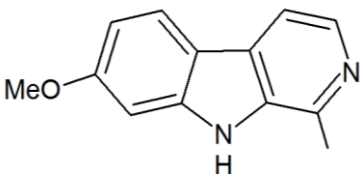
Código	Estrutura	Nomenclatura IUPAC	Fonte
LIG2		1-(3R,4R)-3,4-Bis(1,3-benzodioxol-5-ylmethyl)tetrahydro-2-furanol	Natural/Planta <i>Linum usitatissimum</i> (Linaceae)
NAF2		2-Isopropenyl-2,3-dihydro-1,4-benzodione (mais usado) Dehydroiso-alpha-lapachone	Natural /Planta <i>Tabebuia serratifolia</i> (Vahl) <i>Nicholson</i> (Bignoniaceae)
Mar X1		1H-Purine-2,6-dione, 3,7-dihydro-1,3,7-trimethyl	Natural / Planta <i>Theobroma cacao</i> (Malvaceae))
LIG 1		(2S,3R,4R)-3,4-Bis(1,3-benzodioxol-5-ylmethyl)tetrahydro-2-furanol	Natural/Planta <i>Linum usitatissimum</i> (Linaceae)

Tabela 2- Código da substância semi-sintética, nomenclatura IUPAC, estrutura química e origem da substância

Código	Estrutura	Nomenclatura IUPAC	Fonte
AHON-1		8-nitro-1-methyl-9H-pyrido [3,4b] indole	Sintético/ Harmano Natural / <i>Banisteriopsis caapi</i> (Malpighiaceae)
AHON-2		6-nitro-1-methyl-9H-pyrido [3,4b] indol	Sintético/ Harmano Natural / <i>Banisteriopsis caapi</i> (Malpighiaceae)
AHAN-1		6-nitro-7-methoxy-1-methyl-9H-pyrido [3,4b] indol,	Sintético / Harmina Natural / <i>Banisteriopsis caapi</i> (Malpighiaceae)
AHAN-2		8-nitro-7-methoxy-1-methyl-9 H -pyrido [3,4b] indol	Sintético/ Harmina Natural / <i>Banisteriopsis caapi</i> (Malpighiaceae)
AHO		1metoxi-9H-pyrido-[3,4b] indol	Sintético / Harmano Natural / <i>Banisteriopsis caapi</i> (Malpighiaceae)
AHA		7-methoxy-1-methyl-9H-pyrido [3,4b] indol	Sintético/ Harmano Natural <i>Banisteriopsis caapi</i> (Malpighiaceae)
ACA		9H-carbazol	Sintético/ Natural <i>Murrayakoenigii</i> (Rutaceae)

ACAAC		N-acetyl-carbazol	Sintético/ Natural / <i>Murraya koenigii</i> (Rutaceae)
AHL1		1-Methyl-4,9-dihydro-3H-β-carboline-7-ol	Harmalol Natural / Plant <i>Banisteriopsis caapi</i> (Malpighiaceae)
AHL		7-methoxy-1-methyl-4,9-dihydro-3H-pyrido [3,4-b] indol	Sintético / Harmaline Natural / Plant <i>Banisteriopsis caapi</i> (Malpighiaceae)
AHA1		1-Methyl-2,9-dihydropyrido [3,4-b] indol-7-one	Sintético/ Harmol Natural / Plant <i>Banisteriopsis caapi</i> (Malpighiaceae)

Foram avaliadas quinze substâncias isoladas de plantas oriundas da região amazônica de diferentes grupos químicos: Naftoquinonas, Lignanais, Saponina, Limonóides, Metilxantina, derivados de Ácido Cinâmico, Amida, Cumarina, Triterpeno, Neolignana, Protolimonoides e Esteroide. Assim como substâncias semissintéticas, Harmano e seus derivados obtidos através de processo de nitratação as reações e a purificação dos produtos obtidos foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) em gel de sílica. Os padrões de Harmina, harmano, Harmalina, Carbazol, foram obtidos comercialmente do Sigma-Aldrich (Brasil), não houve nenhuma necessidade para a purificação. Essas substâncias foram isoladas e identificadas, caracterizadas por métodos cromatográficos e espectroscópicos.

Ensaio da atividade antifúngica

Microorganismos

Os fungos utilizados na avaliação pertencem a coleção Fiocruz/Wieland Meyer gentilmente cedidos ao Laboratório de Micologia-INPA, num total de oito (08) culturas de cepas de *Cryptococcus* spp., sendo, quatro (04) de *C. neoformans*, WM 148/08; WM626/08; WM628/08; WM629/08 e quatro (04) de *C. gattii*, WM 179/08; WM178/08; WM179/08; WM 779/08. Estes fungos foram mantidos através em meio ágar Sabouraud Dextrose á 35 °C (Rex *et al.*, 2008).

Concentração inibitória mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada a partir do Método de Microdiluição em Caldo de acordo com o protocolo CLSI M27-A3. Foi realizada a determinação das CIMs das substâncias em placas de 96 poços, adicionados 100µL de cada substância previamente diluída em DMSO (Dimetilsulfóxido) quando apresentar baixa solubilidade ou em água destilada, 100µL de meio caldo RPMI 1640 e 100µL de microorganismo diluído contendo $2,5 \times 10^3$ CFU/mL. A concentração das substâncias testadas, variam de 320 a 0,125µg/mL e 16 a 0,0312 µg/mL (anfotericina B). As placas foram incubadas a temperatura de 35 °C e após, realizadas leituras no intervalo de 48-72h sob observação visual. O CIM das substâncias foi determinado de acordo com protocolo que define um *score* da escala de turbidez compreendendo a menor concentração do composto, capaz de inibir cinquenta por cento (50%) do micro-organismo presente naquela diluição.

Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em réplicas para calcular a média, variabilidade e erro padrão. No presente trabalho, não foram observadas diferenças nos resultados (CIM) nas repetições experimentais.

3. Resultados

Com a finalidade de identificar quais das substâncias que possuíam atividade inibitória frente aos agentes de criptococose, foram avaliadas a atividade das substâncias naturais e semisintéticas de plantas amazônicas em um ensaio de dose resposta em microdiluição. Como pode ser observado (Tabela 3), a substância desidro-iso- α -lapachona (NAF-2) apresentou uma CIM de 80 $\mu\text{g/mL}$ frente *C. neoformans* VNI, enquanto a substância 8 nitroharmano (AHON 1) apresentou CIM de 40 $\mu\text{g/mL}$ frente *C. neoformans* VNI e *C. gattii* VGII sendo que, todas as demais substâncias apresentaram CIM > 320 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 3 – Concentração inibitória mínima (CIM) das substâncias testadas frente as espécies patogênicas do *Cryptococcus neoformans* VNI e *Cryptococcus gattii* VGII

	Micro-organismos	
	<i>C. neoformans</i> VNI	<i>C. gattii</i> VGII
Substâncias	Concentração Inibitória Mínima (CIM)	
AHON-1	40	40
NAF-2	80	160
ISOF-1	160	160
AHAN-1	160	160
ACA	160	160
AHO	160	160
6 A DESACETOXIGEDUNINA	160	160
4 TBP 142 B	160	160
ANFOTERICINA B	0,250	0,065

Para investigar o espectro de ação das substâncias destacadas no *screening* (Tabela 3), determinou-se o CIM de desidro-iso- α -lapachona e 8-nitroharmano contra os demais tipos moleculares do complexo *C. neoformans* e complexo *C. gattii* (Tabela 4). Ambas substâncias foram apresentaram capacidade de inibir os genótipos em concentrações inferiores a 160 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 4 – Concentração inibitória mínima (CIMs) das substâncias desidro-iso- α -lapachona e 8-nitroharmano frente aos genótipos do complexo *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii*

Espécies / Tipo Molecular	Desidro-iso- α - lapachona CIM ($\mu\text{g/mL}$)	8-nitroharmano CIM ($\mu\text{g/mL}$)	Anfotericina B CIM ($\mu\text{g/mL}$)
<i>C. neoformans</i> VNII	80	80	0,25
<i>C. neoformans</i> VNIII	80	40	0,125
<i>C. neoformans</i> VNIV	160	40	0,125
<i>C. gattii</i> VGI	80	80	0,25
<i>C. gattii</i> VGIII	80	40	0,25
<i>C. gattii</i> VGIV	160	160	0,25

4. Discussão

Neste estudo, 15 substâncias foram avaliadas em frente aos agentes causadores da criptococose. Desidro-iso- α -lapachona e 8-nitro Harman destacaram-se por poder inibir todos os genótipos de *Cryptococcus neoformans* (VNI, VNII, VNIII, VNIV) e *Cryptococcus gattii* (VGI, VGII, VGIII, VGIV).

A substância 8-nitroharmano (AHON1), é uma classe de substâncias de alcaloides β carbonilos obtido pela semisíntese de Harmano. Harmina, harmalina e outros relacionados são conhecidos coletivamente como alcalóides de harmala e foram encontrados pela primeira vez na planta *Peganum harmala*, que tem muitos usos medicinais, incluindo o tratamento de infecções fúngicas (Herraiz *et al.*, 2010). Harmine e harmalina (isolados de *P. harmala*), harmol, harmalol, tetrahidroharmina e tetrahidroarmol (sintetizados a partir de harmina e harmalina) foram selecionados previamente para atividade antifúngica contra 8 dermatófitos, 6 fungos filamentosos e 2 *Candida* spp. (Ahmad *et al.*, 1992). Nesse trabalho, com exceção da atividade discreta contra os dermatófitos por harmina, o restante desses compostos era inativo contra fungos (CIM > 500 $\mu\text{g/mL}$). Ainda de acordo com esse trabalho, a harmina exibiu MICs de 50 $\mu\text{g/mL}$ contra *Trichophyton tonsurans*, 75 $\mu\text{g/mL}$ contra *Epidermophyton floccosum* e 100 $\mu\text{g/mL}$ contra *Microsporum canis* e 5 outras *Trichophyton* spp. Substâncias com propriedades antifúngicas e com MIC <100 $\mu\text{g/mL}$ têm sido sugeridas como bons agentes antifúngicos (Vandeputte *et al.*, 2012).

Até onde sabemos, o presente estudo é o primeiro a rastrear alcalóides de harmala, carbazóis e seus derivados para a atividade contra *Cryptococcus* spp. Aqui, nenhuma atividade inibitória significativa foi observada para harmalina, harmane, harmina, harmol ou harmalol contra *Cryptococcus* spp. ($\text{MIC} \geq 160 \mu\text{g} / \text{mL}$) em contraste com a atividade destes compostos contra outros fungos, de acordo com estudos anteriores apresentados acima. Neste trabalho, um novo composto sintético, 8-nitroharmano, que apresenta importante inibição ($\text{MIC} = 40 \mu\text{g} / \text{mL}$) dos genótipos VNI, VNII, VNIII de *C. neoformans* e genótipos VGII, VGIII de *C. gattii* foi revelado.

A substância NAF2 (desidro-iso- α -lapachona), segundo Menezes Filho (2018) as naftoquinonas e fenantroquinonas e as benzoquinonas fazem parte das classes de compostos fenólicos do sistema aromático (quininas aromáticas), possuindo anéis, benzênico, naftalênico e fenantrênico, estando envolvidas em alguns processos fitoterápicos. As naftoquinonas, sejam de origem natural ou sintetizadas, têm sido pesquisadas como potenciais agentes antifúngicos desde a década de 70. Segundo Cipriani (2012), o lapachol da naftoquinona, que foi isolado inicialmente do *Handroanthus impetiginosus* tem propriedades anticancerosas significativas, é a quinona o que ocorre com maior frequência nesta família.

Em levantamento bibliográfico minucioso publicado por Futuro *et al.* (2018) mostrou que em 17 anos de publicação foram avaliadas 691 naftoquinonas quanto a atividade antifúngica contra oito espécies de *Candida* com ênfase para *C. albicans*.

Frações encontradas nas diversas espécies vegetais demonstraram reatividade dos grupamentos químicos característicos (Ravelo *et al.*, 2003). As naftoquinonas sintéticas 2-chloro-3-((4-hidroxifenil) amino) naftaleno-1, 4-Dione], apresentou CIM de $0,78 \mu\text{g}/\text{mL}$ contra cepas *Cryptococcus neoformans* obtendo menor CIM em trabalho anterior quando comparadas com o presente trabalho (Ferreira *et al.*, 2014). Trabalhos realizados em bioensaio com naftoquinonas obtidas através de síntese demonstraram atividade antifúngica contra *Candida* spp., *Aspergillus* spp., dermatofitos e *Fusarium oxysporum* com ação fungistática dos compostos pertencentes a essa classe (Castro *et al.*, 2013). Também foi testada com ação antifúngica na formação de biofilme por *Candida albicans* em cateteres na concentração $5 \mu\text{g} / \text{mL}$ (Sweatha *et al.*, 2016).

O presente trabalho reforça essa classe de substâncias como bons agentes antifúngicos e que podem ser utilizados na indústria de medicamentos. Neste trabalho, a desidro-iso- α -lapachona apresentou inibição ($\text{CIM} = 80 \mu\text{g} / \text{mL}$) frente aos genótipos

VNI, VNII, VNIII de *C. neoformans* e genótipos VGI, VGIII de *C. gattii* sendo considerada uma substância com boa atividade antifúngica.

A investigação de novas substâncias com atividade contra criptococose é importante, pois o atual arsenal terapêutico apresenta efeitos adversos e alta toxicidade. Outros medicamentos igualmente tóxicos e a conjugação dessa terapia são difíceis para a tolerância do paciente. Neste trabalho, foi demonstrado o potencial de substâncias semissintéticas derivadas de β -carbolina como agentes antifúngicos.

No presente trabalho, o 8-nitroharmano e desidro-iso- α -lapachona foram avaliados contra *C. neoformans* e *C. gattii*. Em trabalhos futuros, estes compostos e mais derivados e análogos de β C sintéticos devem ser testados contra estes mesmos, assim como outros *Cryptococcus* spp. patogênicos. Os efeitos sinérgicos também devem ser investigados combinando estes compostos com fungicidas conhecidos como a anfotericina B ou o fluconazol contra *Cryptococcus* spp. Além disso, a toxicidade do 8-nitroharmano e outros β Cs e desidro-iso- α -lapachona para outras linhas celulares humanas normais deve ser avaliada como um meio para verificar possíveis efeitos citotóxicos não observados em fibroblastos. Outros estudos mecanicistas devem ser realizados para tentar averiguar a base molecular e a possível existência de outros modos de ação. Além disso, o potencial do 8-nitroharmano e outros derivados dos alcalóides da harmala (β Cs) e desidro-iso- α -lapachona devem ser avaliados em modelos *in vivo* da infecção por *Cryptococcus* como um meio de testar o conhecimento etnofarmacológico em sistemas onde o metabolismo (como o citocromo P450, conhecido por hidroxilar prontamente o β -carbolinas) e outras interações com o hospedeiro podem ser relevantes.

As limitações do presente trabalho foram: a) as novas drogas foram avaliadas apenas frente à espécie *C. neoformans* e *C. gattii* d) não foram realizados testes *in vivo* avaliando o potencial dessas substâncias. Por outro lado, o trabalho é robusto porque: a) avaliou cinquenta substâncias, derivadas do laboratório de produtos naturais da Amazônia (INPA) e do laboratório de princípios ativos da Amazônia (INPA) frente a 8 diferentes genótipos de agentes da criptococose. O presente trabalho deve ser continuado com os testes *in vivo*, investigando o potencial terapêutico e a toxicidade dessas substâncias.

5. Conclusão

Este trabalho fornece uma descrição do rastreio de 15 substâncias contra duas espécies patogênicas de *Cryptococcus*, bem como a avaliação de desidro-iso- α -lapachona

e 8-nitroharmano contra oito (08) espécies diferentes. Assim como demonstra a importância da investigação antifúngica de produtos naturais de origem vegetal e de substâncias semi-sintéticas como alternativas quimioterápicas para o tratamento de infecções fúngicas para a saúde pública.

Agradecimentos

Agradecemos a Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura por gentilmente fornecer as amostras de *Cryptococcus* para este estudo. Todos os autores receberam apoio da FAPEAM, CNPq e CAPES (pró-Amazônia 2012, N. 47). A AMP gostaria de reconhecer o financiamento recebido do CNPq (PQ Bursary, universal 2014) e FAPEAM (PRONEX).

Financiamento

JVBS reconhece apoio financeiro recebido através dos editais CAPES (Pró-Amazônia 2012, N.47). AMP reconhece apoio financeiro recebido através dos editais CNPq (461971/2014-3) e FAPEAM (PRONEX, 23/2009).

Referências bibliográficas

- Ahmad, A., Ali Khan, K., Sultana, S., Siddiqui, B.S., Begum, S., Faizi, S., Siddiqui, S., 1992. Study of the in vitro antimicrobial activity of harmine, harmaline and their derivatives. J. Ethnopharmacol. 35, 289–294. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(92\)90027-O](https://doi.org/10.1016/0378-8741(92)90027-O)
- Arif, Tasleem ; Mandal , T. K.; Dabur, R., 2009. Natural products : Anti-fungal agents derived from plants. J. Asian Nat. Prod. Res. 11, 621–638. <https://doi.org/10.1080/10286020902942350>
- Barcelos, I.B., Bulian, A.L., Calazans, R. da S.P., Degen, A.N., Alves, L. de O., Sobral, F. de O.S., Salvi, J. de O., 2017. Análise fitoquímica e das atividades citotóxica, antioxidante, e antibacteriana das flores de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson. Rev. Fitos 11, 9–23. <https://doi.org/10.5935/2446-4775.20170002>
- Benarous, K., Bombarda, I., Iriepa, I., Moraleda, I., Gaetan, H., Linani, A., Tahri, D., Sebaa, M., Yousfi, M., 2015. Harmaline and hispidin from *Peganum harmala* and *Inonotus hispidus* with binding affinity to *Candida rugosa* lipase : In silico and in

- vitro studies. *Bioorg. Chem.* 62, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2015.06.005>
- Castro, M.Á., Gamito, A.M., Tangarife-Castaño, V., Zapata, B., Miguel Del Corral, J.M., Mesa-Arango, A.C., Betancur-Galvis, L., San Feliciano, A., 2013. Synthesis and antifungal activity of terpenyl-1,4-naphthoquinone and 1,4-anthracenedione derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 67, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.06.018>
- Cipriani, F., 2012. Implicações químicas na sistemática e filogenia de Bignoniaceae. *Quim. Nova* 35, 2124–2131.
- Cruz, L.R., Spangenberg, T., Lacerda, M.V.G., Wells, T.N.C., 2013. Malaria in South America: A drug discovery perspective. *Malar. J.* 12, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-168>
- Epifano, F., Genovese, S., 2014. Lapachol and its congeners as anticancer agents : a review 37–49. <https://doi.org/10.1007/s11101-013-9289-1>
- Ferreira, M.D.P.S.B.C., Cardoso, M.F.D.C., da Silva, F.D.C., Ferreira, V.F., Lima, E.S., Souza, J.V.B., 2014. Antifungal activity of synthetic naphthoquinones against dermatophytes and opportunistic fungi: preliminary mechanism-of-action tests. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 13, 26. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-13-26>
- Futuro, D.O., Ferreira, P.G., Nicoletti, C.D., B.-L., 2018. The Antifungal Activity of Naphthoquinones : An Integrative Review. *An. Acad. Bras. Cienc.* 90, 187–214.
- Herraiz, T., González, D., Ancín-Azpilicueta, C., Arán, V.J., Guillén, H., 2010. β -Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). *Food Chem. Toxicol.* 48, 839–845. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.12.019>
- Leyva, E., López, L.I., de la Cruz, R.F.G., Espinosa-González, C.G., 2017. Synthesis and studies of the antifungal activity of 2-anilino-/2,3-dianilino-/2-phenoxy- and 2,3-diphenoxy-1,4-naphthoquinones. *Res. Chem. Intermed.* 43, 1813–1827. <https://doi.org/10.1007/s11164-016-2732-3>
- Li, X., Hao, L., Wu, X., 2017. Antii-*Candida albicans* product containing harmine hydrochloride and fluconazole and its application in preparation of antifungal producttle. Chinese Patent 107519167.
- Menezes Filho, A.C.P.M; Castro, F. 2018. Prospeção fitoquímica preliminar dos frutos do jatobá-do- cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* mart. ex hayne) e murici-bravo (*Byrsonima coccolobifolia* kunth). *Glob. Sci. Technol.* 90, 187–214.
- Nenaah, G., 2010. Antibacterial and antifungal activities of (β) -carboline alkaloids

- of *Peganum harmala* (L) seeds and their combination effects. *Fitoterapia* 81, 779–782. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.04.004>
- Niemirowicz, K., Durnaś, B., Piktel, E., Bucki, R., 2017. Development of antifungal therapies using nanomaterials. *Nanomedicine* 12. <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0052>
- O'Halloran, J.A., Powderly, W.G., Spec, A., 2017. Cryptococcosis Today: It Is Not All About HIV Infection. *Curr. Clin. Microbiol. Reports* 88–95. <https://doi.org/10.1007/s40588-017-0064-8>
- Perfect, J.R., Dismukes, W.E., Dromer, F., Goldman, D.L., Graybill, J.R., Hamill, R.J., Harrison, T.S., Larsen, R.A., Lortholary, O., Nguyen, M., Pappas, P.G., Powderly, W.G., Singh, N., Sobel, J.D., Sorrell, T.C., 2010. Clinical Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 50, 291–322. <https://doi.org/10.1086/649858>
- Phipps, S.M., Grundmann, O. 2017. Pharmacology and Structure-Activity Relationship of Natural Products With Psychoactive Effects From *Salvia divinorum*, *Mitragyna speciosa*, and *Ayahuasca*, 1st ed, *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63930-1.00001-6>
- Ravelo, A.G., Estevez-Braun, A., Perez-Sacau, E. 2003. The chemistry and biology of lapachol and related natural products α and β -lapachones. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 29, 719–760. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(03\)80017-0](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(03)80017-0)
- Rex, J.H., Alexander, B.D., Andes, D., Arthington-Skaggs, B., Brown, S.D., Chaturvedi, V., Ghannoum, M. a., Espinel-Ingroff, A., Knapp, C.C., Ostrosky-Zeichner, L., Pfaller, M. a., Sheehan, D.J., Walsh, T.J., 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard - third edition. *Clin. Lab. Stand. Inst.* 1–25.
- Segal Joseph, R.G., 2016. (12) Patent Application Publication (10) Pub . No .: US 2016 / 0326166A1 1.
- Song, H., Liu, Y., Liu, Y., Wang, L., Wang, Q., 2014. Synthesis and Antiviral and Fungicidal Activity Evaluation of. *J. Agric. Food Chem.* 62, 1010–1018.
- Sweatha V. Naira, Gaurav B., Maitrayee C., Arun S., Anil Kumar V., Chinchu B., Asoke B., R.B., 2016. Antimicrobial activity of plumbagin, a naturally occurring naphthoquinone from *Plumbago rosea*, against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *Int. J. Med. Microbiol.* Volume 306, 237–248. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.05.004>

- Tropicos. Missouri, 2016. <<http://www.tropicos.org>>. [WWW Document]. Bot. Gard.
- Vandeputte, P., Ferrari, S., Coste, A.T., 2012. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *Int. J. Microbiol.* 2012, 26. <https://doi.org/10.1155/2012/713687>
- Vrm Reza, H.A., 2007. Cytotoxicity and antimicrobial activity of harman alkaloids *Journal of Pharmacology and Toxicology*. *J Pharmacol Toxicol* 677–680.

7. CAPÍTULO 3

Mecanismo de ação antifúngico e a citotoxicidade das substâncias 2-prop-1-en-2-il-2,3-di-hidrobenzo [f [1] benzofurano-4,9-diona (desidro-iso- α -lapachona) e 8 nitro-1metil-9am-pirido [3, 4b] indol (8 nitro harmano)

Kátia Santana Cruz^{1,2,3}, Maria da Paz Lima⁵, Emerson Silva Lima², Marcia de Jesus Amazonas da Silva², Erica Simplício de Souza⁴, Andréia Montoia², Adrian Martin Pohlit⁵, João Vicente Braga de Souza^{5*}

Resumo

Introdução: Estudo recente vem demonstrando o potencial antifúngico das substâncias 8 nitroharmano e da desidro-iso- α -lapachona. No entanto, ensaios de mecanismos de ação e de citotoxicidade são fundamentais para avaliar a segurança no uso dessas substâncias. O objetivo deste estudo foi investigar o mecanismo de ação e a citotoxicidade do derivado semi-sintético 8 nitroharmano e da substância natural desidro-iso- α -lapachona. **Métodos:** A concentração inibitória mínima (CIM) da substância semi-sintética 8 nitroharmano e da substância natural desidro-iso- α -lapachona frente ao *C. neoformans* VNI foi determinada através de métodos estabelecidos pela Instituto de Padronização Clínico Laboratorial (CLSI). Foi investigado o mecanismo de ação na parede celular (ensaio com sorbitol), no ergosterol de membrana (ensaio com ergosterol exógeno) e no extravasamento celular (dosagem de substâncias que absorvem a 260 nm). A citotoxicidade dessas substâncias foi avaliada frente a linhagem MRC-5 de fibroblastos humanos em ensaio de dose-resposta. **Resultados:** Observou-se que a presença do sorbitol (ensaio de parede celular) não interferiu na CIM das substâncias desidro-iso- α -lapachona (NAF2) e 8 nitroharmano (AHON1). De forma similar, observou-se que presença do ergosterol (ensaio do ergosterol de membrana), não interferiu na CIM das mesmas. No entanto, ambas causaram extravasamento de substâncias que absorvem a 260nm (ensaio de extravasamento). No ensaio de citotoxicidade observou-se que 8-nitroharmano e desidro-iso- α -lapachona não afetaram a viabilidade de fibroblastos humanos normais (MRC-5) ($IC_{50} > 50 \mu g/mL$).

Keywords: Bioensaio antifúngico, Mecanismo de ação, Citotoxicidade

1. Introdução

Em recente estudo realizado por Cruz *et al.* (2019) as substâncias 8-nitroharmano e desidro-iso- α -lapachona foram testadas frente as espécies do complexo *Cryptococcus neoformans* e espécies do complexo *C. gattii* para avaliar seu potencial como antifúngico. Essas substâncias são quimicamente classificadas como alcaloide derivado da β -carbolina e naftoquinona respectivamente. Foram estabelecidas as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) através do protocolo Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI, contra os genótipos VNI e VGII de *C. neoformans* e *C. gattii*, inicialmente. Tais substâncias foram igualmente avaliadas em relação aos genótipos, VNII, VNIII e VNIV, do *C. neoformans* e genótipos do *C. gattii* VGI, VGIII e VGIV. Resultados obtidos por esses autores demonstraram potenciais antifúngicos promissores.

A desidro-iso- α -lapachona, 2-prop-1-en-2-il-2,3-di-hidrobenczo [1] benzofurano-4,9-diona é uma naftoquinona isolada, obtida por fracionamento do extrato metanólico da planta *Tabebuia serratifolia*. (Vahl) G. Nicholson. Conhecida popularmente como ipê amarelo, é uma espécie arbórea, amplamente distribuída no Brasil, com alto valor nominal e ornamental tem sido utilizado pela população do norte do país no tratamento da sífilis, febre, infecções cutâneas da malária, distúrbios do estômago (Cruz *et al.*, 2013). Estudos que demonstrem a atividade antifúngica das naftoquinonas não são escassos, segundo Epifano e Genovese (2014) e Sweatha *et al.* (2016), porém os que demonstrem o mecanismo de ação são escassos de acordo com Futuro *et al.* (2018).

Ensaio anteriores mostraram que os alcalóides harmanos e as β -carbolinas relacionadas (β Cs) exibem importantes propriedades antifúngicas (Verdian Rizi and Hadjiakhoondi, 2007). Harmol é fungicida para *Botrytis cinerea* e fungistático para *Penicillium digitatum* afetando a permeabilização de membranas de conídios em ambas as espécies (Chen *et al.*, 2018). Harmano inibiu seletivamente *Cercospora arachidicola* enquanto seu derivado semi-sintético 8-nitroharmano inibiu fortemente 13 de 14 espécies de fungos testadas (Castro *et al.*, 2013). Uma variedade de análogos sintéticos foram recentemente patenteados como fungicidas para o tratamento de doenças de plantas (Segal Joseph, 2016). De relevância medicinal, harmano (Wahba and Hamann, 2010) e harmina (Herraiz *et al.*, 2010) são relatados como potentes inibidores de

Candida albicans e harmina em combinações binárias com outros (β Cs) que inibem fortemente *Aspergillus niger*. Harmalina inibe significativamente a lipase de *Candida rugosa* *in vitro* como inibidor competitivo de acordo com estudos *in silico* (Benarous *et al.*, 2015). Uma patente recente descreve o aumento, pelo cloridrato de harmina, na ação do fluconazol contra *C. albicans* resistente a drogas em composições que alegam reverter a resistência ao fluconazol (Li and Hao, 2017). Estes e outros exemplos atestam o potencial de harmanos de origem natural ou sintética como agentes antifúngicos para aplicações medicinais e outras. Até onde sabemos, os alcalóides do grupo dos harmanos e seus derivados não foram testados contra *Cryptococcus* spp.

Até o momento, não foram encontrados na literatura estudos de mecanismo de ação das substâncias 8-nitroharmano e desidro-iso- α -lapachona, assim como, de citotoxicidade, para averiguar a segurança no uso de tais substâncias, tornando este trabalho de grande importância no contexto do controle da criptococose em nossa região. O objetivo deste estudo foi investigar o mecanismo de ação e a citotoxicidade do derivado semi-sintético 8 nitroharmano e da substância natural desidro-iso- α -lapachona.

2. Material e Métodos

Micro-organismos padrão

Micro-organismos pertencente a coleção Fiocruz/Wieland Meyer cedidos ao Laboratório de Micologia-INPA foram testadas *Cryptococcus neoformans* WM 148/08 (VNI) e *Candida albicans* ATCC 36232. Para a realização dos testes foram realizados subcultivos em meio ágar Sabouraud dextrose, mantidas a 35 °C. conforme o documento M27-A3 do CLSI (2002) (Rex *et al.*, 2008).

Substâncias avaliadas

Foram avaliadas as substâncias desidro-iso- α -lapachona e a nitroharmano. A desidro-iso- α -lapachona, 2-prop-1-en-2-il-2,3-di-hidrobenczo [f [1] benzofurano-4,9-diona é uma naftoquinona isolada, obtida por fracionamento do extrato metanólico e 8-

nitroharmano, 8 nitro-1metil-9am-Pirido [3, 4b] indol é uma substância da classe dos alcalóides de β -carbolina obtido por semi-síntese de harmano. A substância sintética harmano foi submetida a um processo de nitrção. Essas substâncias foram isoladas e identificadas, caracterizadas por métodos cromatográficos e espectroscópicos além de algumas codificadas, cedidas pelos grupos dos pesquisadores do grupo de pesquisa de Química de Produtos Naturais da Prof^a Maria da Paz Lemos e do pesquisador Adrian Martin Pohlit do Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia, do Instituto de Pesquisa da Amazônia-INPA.

As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram determinadas a partir do método de microdiluição em caldo de acordo com o protocolo CLSI M27-A3. Foi realizada a determinação das CIMs das substâncias em placas de 96 poços, adicionados 100 μ L de cada substância previamente diluída em DMSO (Dimetilsulfóxido) para substâncias de baixa solubilidade ou em água destilada, 100 μ L de meio caldo RPMI 1640 e 100 μ L de micro-organismo diluído contendo $2,5 \times 10^3$ CFU/mL. A concentração final das substâncias testadas, foi de 320 a 0,125 μ g/mL e 16 a 0,0312 μ g/mL (anfotericina B). As placas foram incubadas a temperatura de 35 °C e após, realizadas leituras no intervalo de 48-72h sob observação visual. O CIM das substâncias foi determinado de acordo com protocolo que define um *score* da escala de turbidez compreendendo a menor concentração do composto, capaz de inibir cinquenta por cento (50%) do micro-organismo presente naquela diluição.

Determinação do mecanismo de ação *in vitro* das substâncias desidro-iso- α -lapachona and 8-nitroharmano

Ensaio do Sorbitol

Para investigar a possível influência, na parede da célula, as substâncias que apresentaram atividade antifúngica, foram submetidas ao ensaio do sorbitol (Sigma-Aldrich), de acordo com a metodologia descrita pela CLSI, em concentração 0,8M. As substâncias foram testadas com variação de concentrações de 320 a 0,125 μ g/mL frente a cepas padrões *C. neoformans* VNI e *C. albicans* ATCC 36232. O ensaio constou em, observar a variação das CIMs ao submeter a substância na presença e ausência do sorbitol

na concentração descrita e observar após 72h para *C. neoformans* VNI e *C. albicans* em incubação a 35 °C. O ensaio foi realizado em duplicata (Carrasco *et al.*, 2012).

Ensaio do efeito do ergosterol

O ensaio foi realizado a partir de CIMs das substâncias que apresentaram atividade frente a cepas de *C. neoformans* VNI e *C. albicans* ATCC 36232 nas concentrações finais de substância variando de 320-0,125 µg/mL de acordo com protocolo CLSI com adição de Ergosterol (Sigma-Aldrich) nas concentrações (200- 800- 1.600 µg/mL) assim como em sua ausência. O antibiótico usado como controle foi a anfotericina B, sendo a reação observada 72h para *C. neoformans* VNI e *C. albicans* em incubação a 35 °C. O ensaio foi realizado em duplicata (Miron *et al.*, 2014).

Mensuração de extravasamento nucleotídico

Células de *C. neoformans* VNI e *C. albicans* ATCC 36232 foram cultivadas por agitação a 35 °C até à fase estacionária precoce (18 horas de crescimento). Após incubação lavadas e ressuspensas com tampão morpholinepropanesulfônico - MOPS a 0,16M, pH 7,0) (Sigma-Aldrich), para preparo dos inóculos. Microtubos (volume final 500 µL) contendo inóculos (5×10^4 células/mL), e a substância com atividade em 1 x, 4x CIM. Após foram incubados durante 6 h. Nos tempos 1, 2, 4, e 6 horas, os tubos foram centrifugados (5 min a 3000 rpm), e os sobrenadantes (100 µL) foram diluídos 10x e lidos a 260 nm de absorção (Gene Quant DNA/RNA), o ensaio foi realizado em duplicata. Considerando-se 100% de liberação a absorbância produzida pelas células tratadas com 1,2 mol/L de HClO₄ a 100 °C, 30 min (Escalante *et al.*, 2008).

Teste de citotoxicidade em fibroblastos

As linhagens celulares MRC-5 (fibroblastos humanos) foram cultivadas em meio DMEM (Meio de Dulbecco de Meio Eagle) suplementado com 10% de soro bovino fetal, 2 mmol/L⁻¹ de glutamina, 100 µg/mL⁻¹ de estreptomicina e 100 U/mL⁻¹ de penicilina e incubado a 37 °C com uma atmosfera de 5% de CO₂. As células foram tratadas com as amostras e com o método de ensaio AlamarBlue™. Resumidamente, após 24 h de cultura, os extratos foram dissolvidos individualmente em DMSO e adicionados a cada

poço (em concentrações finais de 0,781 - 50 $\mu\text{g/mL}^{-1}$) e incubados por 72 h. Doxorubicina (5 $\mu\text{g/mL}^{-1}$) foi usada como controle positivo. Os controles negativos (brancos) receberam a mesma quantidade de DMSO e tiveram as mesmas concentrações finais de DMSO que as amostras (0,1%). Duas horas antes do final das incubações, 10 μL de Alamar-Blue™ foram adicionados a cada poço. O sinal fluorescente foi monitorizado com um leitor de multiplicação utilizando uma gama de comprimentos de onda de excitação de 530 a 560 nm e um comprimento de onda de emissão de 590 nm. O sinal fluorescente gerado a partir do ensaio foi proporcional ao número de células vivas na amostra, de acordo com as especificações do fabricante. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada conforme a seguinte fórmula: %viabilidade = fluorescência da amostra x 100/ fluorescência do controle (Nakayama *et al.*, 1997).

Todos os experimentos foram realizados em repetições para calcular média, variabilidade e erro padrão. No presente trabalho, não foram observadas diferenças nos resultados (CIM) nas repetições experimentais.

3. Resultado

Mecanismo de ação da desidro-iso- α -lapachona e do 8 nitroharmano

Com a finalidade de conhecer-se mais sobre a substância desidro-iso- α -lapachona e 8-nitroharmano, ensaios preliminares foram realizados para avaliar se essas substâncias estavam atuando frente a parede celular (influência do sorbitol), ergosterol (influência do ergosterol) e/ou no controle da membrana plasmática (ácidos nucleicos). As tabelas 1, 2, 3 e 4 apresentam os resultados desses ensaios.

Ensaio do Sorbitol

O ensaio conhecido como “Proteção do Sorbitol” foi realizado para determinar a existência de influência da desidro-iso- α -lapachona (NAF2) e do 8-nitroharmano (AHON1) sobre a integridade da parede celular de fungos. Neste ensaio, as determinações da CIM da desidro-iso- α -lapachona (NAF2) e do 8-nitroharmano (AHON1) foi frente *C. neoformans* VNI e *C. albicans* ATCC 36232. Os ensaios foram realizados, em paralelo, na presença e ausência de sorbitol (0,8 M), um protetor osmótico utilizado para a

estabilização de protoplastos fúngicos. Entende-se que um composto que interfere negativamente na formação parede celular do fungo terá sua CIM deslocada para um valor mais elevado, na presença do suporte osmótico. A CIM da NAF2 e AHON1 não variou na presença de sorbitol, após 72 horas de incubação, o que sugere que NAF2 e AHON1 não atuam através da inibição dos mecanismos que controlam a síntese ou a existência da parede celular (Tabela 1).

Tabela 1 - Efeito do sorbitol (200–800 $\mu\text{g/mL}$) na CIM desidro-iso- α -lapachona e 8-nitroharmano frente a *C. albicans* ATCC 36232 e *Cryptococcus neoformans* VNI

Substâncias	<i>Cryptococcus neoformans</i> VNI		<i>C. albicans</i> ATCC 36232	
	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$) presença de sorbitol (0,8M)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$) na presença do sorbitol (0,8M)
desidro-iso- α -lapachona	80	80	160	160
8-nitro harmano	40	40	160	160
Anfotericina B	0,065	0,065	0,5	0,5

Ensaio do efeito do ergosterol

Para determinar se a desidro-iso- α -lapachona (NAF2) e do 8-nitroharmano (AHON1), causavam alterações no ergosterol de membrana, foi realizado o “Ensaio do Ergosterol”. Este ensaio identifica se um composto atuava ligando-se ao ergosterol da membrana dos fungos e fundamenta-se no fornecimento de ergosterol exógeno. Um composto que possui afinidade pelo ergosterol forma complexos rapidamente com o ergosterol livre, evitando que ocorra a complexação com o ergosterol da membrana fúngica. Como consequência, ocorre um aumento da CIM. Nos resultados apresentados (Tabela 2) observa-se que a CIM da NAF2 e do AHON1 frente a células de *C. neoformans* VNI não aumentou na presença de diferentes concentrações (400 a 1600 $\mu\text{g/mL}$) de ergosterol exógeno. Sugerindo, portanto, que desidro-iso- α -lapachona e 8-nitroharmano, não atuam interagindo com o ergosterol.

Tabela 2 - Efeito do ergosterol exógeno (400–1600 µg/mL) na CIM da desidro-iso- α -lapachona e 8-nitroharmano e anfotericina B frente a *C. albicans* ATCC 36232 e *Cryptococcus neoformans* VNI

Substâncias	<i>Cryptococcus neoformans</i> VNI				<i>C. albicans</i> ATCC 36232			
	CIM (µg/mL) na presença do ergosterol				CIM (µg/mL) na presença do ergosterol			
	Controle	(400 µg/mL)	(800 µg/mL)	(1600 µg/mL)	Controle	(400 µg/mL)	(800 µg/mL)	(1600 µg/mL)
desidro-iso- α -lapachona	80	80	80	80	160	160	160	160
8-nitroharman	40	40	40	40	160	160	160	160
Anfotericina B	0,065	0,065	0,250	0,500	0,5	0,5	1,0	2,0

Mensuração de extravasamento nucleotídico

O ensaio do extravasamento de nucleotídeos que absorvem a 260 nm foi desenvolvido com intuito de evidenciar se as substâncias testadas, desidro-iso- α -lapachona (NAF2) e do 8-nitroharmano (AHON1) produziram interferência na membrana de *C. neoformans* VNI, sabendo-se que a ruptura da membrana causa extravasamento de componentes intracelulares (da célula fúngica como os nucleotídeos) que podem ser medidos em absorbância no comprimento de onda de 260nm, assim o ensaio foi realizado nas concentrações de 1x a CIM e 4x a CIM, os resultados foram obtidos a partir das leituras efetuadas as 2, 4 e 6h. Os resultados mostraram que 1 x desidro-iso- α -lapachona e 8-nitroharmano causaram aumentos de 6, 9, 17 e 21% em 1, 2, 4 e 6 horas, respectivamente, em comparação com o controle do ácido perclórico, que é considerado para produzir 100% de extravasamento celular (Tabelas 3 e 4). Além disso, o tratamento de 4 x MIC causou um aumento de 2,6 x no escapamento do nucleotídeo, tendo por resultado 14, 25, 42 e 61% aumentos no escapamento em 1, 2, 4 e 6 horas, respectivamente, comparados ao controle do ácido perclórico.

Tabela 3 - Extravasamento de substâncias a 260 nm frente a *C. neoformans* VNI e *C. albicans* ATCC 36232 incubadas (1–6 h) com 1x e 4x a CIM do 8-nitro harmano

Extravasamento celular									
Substâncias	<i>Cryptococcus neoformans</i>				Substâncias	<i>C. albicans</i> ATCC 36232			
	VNI								
	1h	2h	4h	6h		1h	2h	4h	6h
8-nitro harmano (40 µg/mL)	0	10	30	60	8-nitro harmano (160 µg/mL)	0	10	30	60
8-nitro harmano (160 µg/mL)	10	40	50	60	8-nitro harmano (640 µg/mL)	10	40	50	60
Ac. Percloroacético (1,2M)	100	100	100	100	Ac. Percloroacético (1,2M)	100	100	100	100
Control	0	0	0	0	Control	0	0	0	0

Tabela 4 - Extravasamento de substâncias a 260 nm frente a *C. neoformans* VNI e *C. albicans* ATCC 36232 incubadas (1–6 h) com 1x e 4x CIM de desidro-iso- α -lapachona

Extravasamento celular									
Substâncias	<i>Cryptococcus neoformans</i>				Substâncias	<i>C. albicans</i> ATCC 36232			
	VNI								
	1h	2h	4h	6h		1h	2h	4h	6h
desidro-iso- α -lapachona (80 μ g/mL)	0	10	30	60	desidro-iso- α -lapachona (160 μ g/mL)	0	10	30	60
desidro-iso- α -lapachona (320 μ g/mL)	10	40	50	60	desidro-iso- α -lapachona (640 μ g/mL)	10	40	50	60
Ac. Percloroacético (1,2M)	100	100	100	100	Ac. Percloroacético (1,2M)	100	100	100	100
Control	0	0	0	0	Control	0	0	0	0

Teste de Citotoxicidade

Quanto ao ensaio de citotoxicidade, 8-nitroharmano e desidro-iso- α -lapachona demonstraram não afetar a viabilidade de fibroblastos humanos normais (MRC-5) (IC₅₀ > 50 µg/mL) após 24 h de exposição. A doxorrubicina padrão citotóxica exibiu IC₅₀ = 0,34 (0,27-0,43) µg/mL.

Discussão

Neste estudo, foram avaliadas 15 substâncias frente aos agentes causadores da criptococose. Quatro substâncias testadas foram derivadas do isolamento de plantas da floresta amazônica e onze eram substâncias semi-sintéticas. Desidro-iso- α -lapachona e 8-nitroharmano destacaram-se por serem capazes de inibir todos os genótipos de *Cryptococcus neoformans* (VNI, VNII, VNIII, VNIV) e *Cryptococcus gattii* (VGI, VGII, VGIII, VGIV). Também, o desidro-iso- α -lapachona e 8-nitroharmano apresentaram a baixa toxicidade quando submetidos a células de fibroblasto cultivadas (MRC-5). Foi observado ainda que o desidro-iso- α -lapachona e o 8-nitroharmano possuem mecanismos de ação relacionados ao vazamento de substâncias que absorvem a 260 nm.

O caráter anticriptocócico das drogas desidro-iso- α -lapachona e 8-nitroharmano demonstrado através deste trabalho é de grande importância por se tratar de uma possível opção a ser utilizada no tratamento desta doença que possui poucas opções terapêuticas segundo Coelho & Casadeval (2016).

O tratamento preconizado para a criptococose segundo os protocolos já estabelecidos (Perfect *et al.*, 2010) sinalizam a anfotericina B como droga de uso no controle da carga fúngica, sendo esta droga associada a nefrotoxicidade desta principalmente em pacientes portadores do vírus HIV de acordo com Negroni (2010).

A substância desidro-iso- α -lapachona, 2-prop-1-en-2-yl-2,3-dihydrobenzo [f [1] benzofuran-4,9-dione é um naftoquinona isolado obtida pelo fracionamento do extrato metanólico da planta *Tabebuia serratifolia* (Vahl) G. Nicholson conhecida popularmente como ipê amarelo, é espécie arbórea, amplamente distribuída no Brasil, com alto valor econômico e ornamental. Esta substância vem desde o seu primeiro isolamento em 1882, objeto de pesquisas que já revelaram propriedades anti-tripanicida, anti-tumoral dentre outras (Pinto *et al.*, 2009, Epifano *et al.*, 2014).

Os avanços na síntese química indicavam que ser possível sintetizar em laboratório substâncias derivadas de plantas com interesse farmacêutico (Simões *et al.*, 2017). Inúmeros trabalhos mostram desde a década de 90, que a síntese de fármacos atinge cerca de 75% do total de fármacos utilizados no mundo e, ainda que se

compararmos as estruturas dos medicamentos naturais e sintéticos, observa-se que 62% dos fármacos são derivados heterocíclicos. Destes 91% possuem pelo menos um átomo de nitrogênio, 25% um átomo de enxofre e muitos possuem mais de um heterátomo em suas estruturas (Wermuth *et al.*, 1992).

A substância 8 nitroharmano ou 8 nitro-1metil-9am-pirido [3, 4b] indolpertence a classe, dos alcalóides β carbonilos obtido por processo de nitração da substância sintética harmano. Os alcalóides harmalina, harmina e harmano podem ser isoladas da planta *Banisteriopsis caapi*, nativa da América do Sul e tradicionalmente usada por indígenas da floresta amazônica em chá de infusão, como parte dos vegetais utilizados no ritual de Ayuasca, que apresenta uma forte atividade inibidora da enzima monoamino oxidase (MAO), conferindo segundo Phipps *et al.* (2017), efeito alucinógeno a ao chá.

De acordo com Nenaah (2010) em testes de disco difusão realizados com as substâncias β carbonilos harmina, harmano e harmalina contra *Candida albicans* demonstrou maior sensibilidade para o harmano. Alcaloides β carbonilos são utilizados no nordeste da China em medicina popular como medicamento anti-cancer e anti-malaricida (Rihui *et al.*, 2007).

Os ensaios de mecanismos de ação demonstraram que as substâncias não apresentaram atividade frente a parede celular e nem frente ao ergosterol de membrana. Não atuaram na parede celular (não houve alteração de CIM na presença do protetor osmótico - sorbitol) ou no ergosterol (não houve alteração de CIM na presença de ergosterol extracelular). Segundo Cabral (2015) a anfotericina liga-se às membranas celulares e interfere na permeabilidade e nas funções de transporte formando um poro na membrana, criando com a parte central hidrofílica da molécula um canal iônico transmembrana tendo como consequência a perda de íons potássio intracelulares. Ainda, segundo o autor outro grupo de antifúngicos muito utilizados, os Azóis (fluconazol, itraconazol, cetoconazol, miconazol e econazol) agem na inibição de as enzimas responsáveis pela síntese do ergosterol P450 fúngicas (a esterol desmetilase), o principal esterol encontrado na membrana das células fúngicas acarretando na depleção de ergosterol alterando a fluidez da membrana tendo como efeito global a inibição da replicação fúngica.

Ambas as substâncias resultaram no extravasamento de substâncias que absorvem a 260 nm, resultando no transbordamento extracelular de nucleotídeos demonstrado pela saída de ácidos nucléicos do meio intracelular podendo assim ser consideradas como substâncias castrópicas (substâncias que diminuem a estruturação das moléculas de água ao redor de íons).

No ensaio de citotoxicidade, as substâncias apresentaram CIM > que 50 µg /mL, revelando baixa toxicidade. Segundo revisão efetuada por Fonseca *et al.* (2013) extratos brutos de plantas contendo uma naftoquinona, o lapachol foram testados e apresentaram atividade anti tumor, anti bactérias Gram-positivos e bactérias ácido resistentes, anti ulcerogênica, atividade anti-inflamatória, e apresentaram baixa toxicidade. Em estudo realizado por Coloma *et al.* (2012), naftoquinonas testada contra *Trypanosoma cruzi* apresentou expressiva atividade e baixa citotoxicidade.

Ensaio de mecanismo de ação e citotoxicidade não são abundantes na literatura e se tornam cada vez mais importantes na efetiva busca de novos fármacos, principalmente contra patógenos oportunistas como os agentes da criptococose. As substâncias ora apresentadas, desidro-iso- α -lapachona e 8-nitroharmano devem ser testadas em trabalhos futuros quanto a toxicidade para outras linhagens celulares humanas normais deve ser avaliada como um meio para verificar possíveis efeitos citotóxicos não observados em fibroblastos. Outros estudos mecanicistas devem ser realizados para tentar averiguar a base molecular e a possível existência de outros modos de ação. Além disso, o potencial do 8-nitroharmano e outros derivados dos alcalóides da harmala (β Cs) e desidro-iso- α -lapachona devem ser avaliados em modelos *in vivo* da infecção por *Cryptococcus* como um meio de testar o conhecimento etnofarmacológico em sistemas onde o metabolismo (como o citocromo P450, conhecido por hidroxilar prontamente o β -carbolinas) e outras interações com o hospedeiro podem ser relevantes.

As limitações do presente trabalho foram: a) Os novos fármacos foram avaliados apenas frente à espécie *C. neoformans*, *C. gattii* e *C. albicans*; b) Apenas uma linhagem celular foi usada em testes de toxicidade (MRC-5); c) Apenas três testes de mecanismo de ação foram avaliados; d) Nenhum teste *in vivo* foi realizado avaliando o potencial dessas substâncias. Por outro lado, o trabalho é robusto porque: a) avaliou quinze substâncias, derivadas do Laboratório de Produtos Naturais da Amazônia (INPA) e

Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia (INPA) frente a 8 diferentes genótipos de agentes de a criptococose; b) demonstraram a baixa toxicidade celular diante de uma das culturas celulares mais amplamente utilizadas na literatura (MCR-5) e C) investigaram os dois mecanismos de ação mais importantes entre os antifúngicos (influência na parede celular e na ergosterol). O presente trabalho deve ser continuado com testes *in vivo* que investigam o potencial terapêutico e a toxicidade dessas substâncias.

Este estudo confirma que a investigação de novas substâncias com atividade frente à criptococose é importante pelos fatores limitam as drogas utilizadas. O presente trabalho demonstra o potencial de substâncias semi-sintéticas e substâncias provenientes da floresta amazônica. Especificamente, duas novas substâncias potenciais consideradas promissoras para sua utilização como fármaco no combate a criptococose.

4. Conclusão

Este trabalho demonstrou que duas substâncias originadas de plantas, sendo, uma de origem natural a desidro-iso- α -lapachona e outra de origem semi-sintéticas, o 8-nitroharmano são promissores agentes antifúngicos e a baixa toxicidade apresentada os qualifica para testes complementares objetivando a sua transformação em produto farmacêutica a ser utilizada no combate a criptococose.

Agradecimentos

Agradecemos a Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura por gentilmente fornecer as amostras de *Cryptococcus* para este estudo. Todos os autores receberam apoio da FAPEAM, CNPq e CAPES (pró-Amazônia 2012, N. 47). A AMP gostaria de reconhecer o financiamento recebido do CNPq (PQ Bursary, universal 2014) e FAPEAM (PRONEX).

Financiamento

O JVBS reconhece o apoio recebido da CAPES (pró-Amazônia 2012, N. 47). AMP reconhece o apoio recebido de CNPq (461971/2014-3) e FAPEAM (PRONEX, 23/2009).

Referências

- Benarous, K., Bombarda, I., Iriepa, I., Moraleda, I., Gaetan, H., Linani, A., Tahri, D., Sebaa, M., Yousfi, M., 2015. Harmaline and hispidin from *Peganum harmala* and *Inonotus hispidus* with binding affinity to *Candida rugosa* lipase : In silico and in vitro studies. *Bioorg. Chem.* 62, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2015.06.005>
- Carrasco, H., Raimondi, M., Svetaz, L., Di Liberto, M., Rodriguez, M. V., Espinoza, L., Madrid, A., Zacchino, S., 2012. Antifungal activity of *Eugenol analogues*. Influence of different substituents and studies on mechanism of action. *Molecules* 17, 1002–1024. <https://doi.org/10.3390/molecules17011002>
- Castro, M.Á., Gamito, A.M., Tangarife-Castaño, V., Zapata, B., Miguel Del Corral, J.M., Mesa-Arango, A.C., Betancur-Galvis, L., San Feliciano, A., 2013. Synthesis and antifungal activity of terpenyl-1,4-naphthoquinone and 1,4-anthracenedione derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 67, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.06.018>
- Chen, C., Long, L., Zhang, F., Chen, Q., Chen, C., Yu, X., Liu, Q., Bao, J., Long, Z., 2018. Antifungal activity, main active components and mechanism of *Curcuma longa* extract against *Fusarium graminearum*. *PLoS One* 13, 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194284>
- Cruz, K. S., Lima, E. S., Silva, M. J.A., Souza, E. S., Montoia, A., Pohlitz, A. M., Souza, J. V. B., 2019. Screening and Antifungal Activity of a β -Carboline Derivative against *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*. *Int. J. Microbiol.* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7157845>
- Escalante, A., Gattuso, M. P., Zacchino, S., 2008. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. *J. Nat. Prod.* 71, 1720–1725. <https://doi.org/10.1021/np070660i>
- Futuro, D. O., Ferreira, P. G., Nicoletti, Borba-Santos, L.P., Silva, F.C.D., Rozental, S., Ferreira, V.F., 2018. The Antifungal Activity of Naphthoquinones: An Integrative Review. *An. Acad. Bras. Cienc.* 90, 187–214. doi: 10.1590/0001-3765201820170815.
- Herraiz, T., González, D., Ancín-Azpilicueta, C., Arán, V.J., Guillén, H., 2010. β -Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). *Food Chem. Toxicol.* 48, 839–845. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.12.019>

- Li, X., Hao, L. W. X., 2017. Anti-*Candida albicans* product containing harmine hydrochloride and fluconazole and its application in preparation of antifungal product. Chinese Patent 107519167, 2017.
- Miron, D., Battisti, F., Silva, F.K., Lana, A.D., Pippi, B., Casanova, B., Gnoatto, S., Fuentefria, A., Mayorga, P., Schapoval, E.E.S., 2014. Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts. *Rev. Bras. Farmacogn.* 24, 660–667. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.10.014>
- Nakayama, G. R., Caton, M. C., Nova, M. P., Parandoosh, Z., 1997. Assesment of the Alamar Blue Assay for cellular growth and viability in vitro. *J. Immunol. Methods* 204, 205–208.
- Rex, J.H., Alexander, B.D., Andes, D., Arthington-Skaggs, B., Brown, S.D., Chaturvedi, V., Ghannoum, M. A., Espinel-Ingroff, A., Knapp, C.C., Ostrosky-Zeichner, L., Pfaller, M. A., Sheehan, D.J., Walsh, T.J., 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard - third edition. *Clin. Lab. Stand. Inst.* 1–25.
- Segal Joseph, R.G. 2016. (12) Patent Application Publication (10) Pub . No .: US 2016 / 0326166A1 1.
- Simões, C., Schenkel, E., Mello, J. et al., 2017. Farmacognosia do produto natural ao medicamento.
- Verdian Rizi, M.R., Hadjiakhoondi, A., 2007. Cytotoxicity and antimicrobial activity of harman alkaloids. *J Pharmacol Toxicol.* <https://doi.org/10.3923/jpt.2007.677.680>
- Wahba, A.E., Hamann, M.T., 2010. New one-pot methodologies for the modification or synthesis of alkaloid scaffolds. *Mar. Drugs* 8, 2395–2416. <https://doi.org/10.3390/md8082395>
- Wermuth, C., 1992. Medicinal Chemistry for to 21 st Century. Oxford.

8. CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ A substância semi-sintética 8 nitroharmano, assim como, a substância de origem vegetal desidro-iso- α -lapachona, apresentam potencial de ação antifúngica e baixa toxicidade considerando duas substâncias promissoras no tratamento da criptococose.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, G. S. B. et al. Molecular typing of environmental *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complex isolates from Manaus, Amazonas, Brazil. **Mycoses**, v. 59, n. 8, p. 509–515, 2016.
- BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 14 : medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*. **Yeast**, v. 27, n. 11, p. 875–904, 2010.
- BARTLETT, K.H. et al. Decade of Experience : *Cryptococcus gattii* in British Columbia. **Mycopathologia**, v. 173, n. 5-6, p. 311–9, 2012.
- BRITO-SANTOS, F. et al. Environmental Isolation of *Cryptococcus gattii* VGII from Indoor Dust from Typical Wooden Houses in the Deep Amazonas of the Rio Negro Basin. **PloS one**, v. 10, n. 2, 2015.
- CAO, R. et al. Beta-carboline alkaloids: biochemical and pharmacological functions. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 4, p. 479–500, 2007.
- CHAMMARD, T. B. et al. Diagnostic and therapeutic strategies in cryptococcosis : impact on outcome. **Memórias do instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, p. 1–6, 2018.
- COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. The Tools for Virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Adv Appl Microbiol**, v. 87, p.1–41, 2014.
- COGLIATI, M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. **Scientifica**, v. 2013, p. 1-23, 2013.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2014.
- CRUZ-SILVA, S. et al. Antifungal potential of extracts and fractions of *Randia nitida* leaves on soybean pathogens and their phytochemistry. **Rev. Caatinga**, v. 29, n. 3, p. 594–602, 2016.
- FELICIANO, L. M. et al. Heteroresistance to Fluconazol in Clinical and Environmental Brazilian Heteroresistance to Fluconazol in Clinical and Environmental Brazilian Strains of *Cryptococcus neoformans* / *C. gattii* Species Complex. **Current Fungal Infection Reports**, v.11, n. 4, p. 190–196, 2017.
- FRANCISCO, F. DAS et al. Glicoalcaloides antifúngicos flavonoides e outros constituintes químicos de. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 284–288, 2011.
- GIBSON, J.F.; JONSTON, S. A. Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* during cryptococcosis. **Fungal Genet Biol**, v. 78, p. 76–86, 2015.
- GULLO, F. Cryptococcosis: Epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for

treatment. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 32, n. 11, p. 1377–1391, 2013.

HSU, M. J. et al. Cell apoptosis induced by a synthetic carbazole compound LCY-2-CHO is mediated through activation of caspase and mitochondrial pathways. **Biochem Pharmacol**, v. 70, n. 1, p. 102–112, 2005.

IDNURAM, A.; LIN, X. Rising to the challenge of multiple *Cryptococcus* species and the diseases they cause. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 1–6, 2015.

JARVIS, J. N. et al. Cost effectiveness of cryptococcal antigen screening as a strategy to prevent HIV-associated cryptococcal meningitis in South Africa. **PloS one**, v. 8, n. 7, 2013.

JÚNIOR, C. V. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Quim Nova**, v. 26, n. 3, p. 390–400, 2003.

KATIIYAR, C. et al. Drug discovery from plant sources: An integrated approach. **Ayu**, v. 33, n. 1, p. 10–19, 2012.

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

KWON-CHUNG, K. J. et al. The Case for Adopting the “Species Complex” Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. **mSphere**, v. 2, n. 1, p. 357–16, 2017.

KWONG-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. **Medical Mycology**. 1. ed. Philadelphia: Library of Congress, 1992.

LOYSE, A. et al. Cryptococcal meningitis: improving access to essential antifungal medicines in resource-poor countries. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 13, n. 7, p. 629–37, 2013.

MARQUES, J. V. et al. Antifungal activity of natural and synthetic amides from *Piper* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 10, p. 1807–1813, 2010.

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

MONTOIA, A. **Semi-Síntese de derivados da elipticina e atividade antimalárica de isolados e infusão de *Aspidosperma vargasii***. 2013. 107 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

MOURAD, A.; PERFECT, J. R. The war on cryptococcosis: A Review of the antifungal arsenal. **Memórias do instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, 2018.

NANDY, B. C. et al. Carbazole: It’s biological activity. **of Biomedical and**

Pharmaceutical Research, v. 3, n. 1, p. 42–48, 2014.

NEGRONI, R. Cryptococcosis. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 6, p. 599–609, 2012.

PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacogn Rev**, v. 6, n. 11, p. 1–5, 2012.

PERFECT, J. R.; CASADEVALL, A. The History of *Cryptococcus* and Cryptococcosis. **ASM press**, p. 17–26, 2011.

PERFECT, J. R. et al. Clinical Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 3, p. 291–322, 2010.

PERSONETT, H. A. et al. Renal Recovery following Liposomal Amphotericin B- Induced Nephrotoxicity. **International Journal of Nephrology**, v. 1, 2019.

PIROFSKI, L-A; CASADEVALL, A. Immune-Mediated Damage Completes the Parabola: *Cryptococcus neoformans* Pathogenesis Can Reflect the Outcome of a Weak or Strong Immune Response. **mBio**, v. 8, n. 6, 2017.

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

ROCHA, D. F. S. et al. MLST reveals a clonal population structure for *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI isolates from clinical sources in Amazonas, Northern-Brazil. **Plos One**, v.13, n. 6, p. 1-15, 2018.

RODRIGUES, M. L. Neglected disease, neglected populations: the fight against *Cryptococcus* and cryptococcosis. **Memórias do instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, p. 7–8, 2018.

SAAG, M.S. et al. Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, n. 4, p. 710–8, 2000.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia do produto natural ao medicamento**. 1. ed. ArtMed, 2017.

SOUZA, V. A.; NAKAMURA, C. V.; CORREA, A. G. Antichagasic activity of lignans and neolignans. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 2, p. 197–207, 2012.

STONE, N. R. H. et al. Dynamic ploidy changes drive fluconazole resistance in human cryptococcal meningitis. **The Journal of Clinical Investigation**, v.129, n.3, p. 999–1014, 2019.

TRILLES, L. et al. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Memórias do instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 455–462, 2008.

UNAIDS. Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic. **Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/Aids**. 2012.

VIDYASAGAR, G. M.; SINGH, S. In-vitro antidermatophytic and preliminary phytochemical studies of petroleum ether and Inter-polar methanolic leaf extracts of *Thevetia nerriifolia*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 4, p. 81–5, 2014.

WERMUTH, C. et al. **Medicinal Chemistry for to 21 st Century**. Oxford: [s.n.]. 1992.

WHO. The diagnosis, prevention and management of cryptococcal disease in hiv-infected adults, adolescents and children. **World Health Organization**. 2018.

WIDHALM, J. R.; RHODES, D. Biosynthesis and molecular actions of specialized 1,4-naphthoquinone natural products produced by horticultural plants. **Horticulture Research**, v. 3, 2016.

WILLIAMSON, P. R.; JARVIS, J. N; PANACKAL, A. A, F. M. Cryptococcal meningitis: epidemiology, immunology, diagnosis and therapy. **Nature Publishing Group**, v. 13, p. 12-24, 2017.

YAMAGUCHI, K. K. L.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Atividades biológicas dos óleos essenciais de *E. citriodora*, uma Lauraceae rica em geranato de metila. **Química Nova**, v. 36, n. 6, p. 826–830, 2013.

ZHANG, S. et al. Tuning the Optoelectronic Properties of 4,4'-N,N'-Dicarbazole-biphenyl through Heteroatom Linkage: New Host Materials for Phosphorescent Organic Light-Emitting Diodes. **Org. Lett**, v. 12, n. 15, p. 3438–3441, 2010.

10. APÊNDICE

1- Artigo Referente a Tese

Artigo Pulicado no International Journal of Microbiology

- Cruz K.S, Lima ES, Jesus M De, Simpl E, Souza D, Montoia A, et al. Screening and Antifungal Activity of a β -Carboline Derivative against *Cryptococcus neoformans* and *C . gattii*. (2019).

Research Article

Screening and Antifungal Activity of a β -Carboline Derivative against *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*

Kátia Santana Cruz,^{1,2,3} Emerson Silva Lima,² Marcia de Jesus Amazonas da Silva,² Erica Simplicio de Souza,⁴ Andreia Montoia,² Adrian Martin Pohlit ,⁵ and João Vicente Braga de Souza⁵

¹Programa de Pós-Graduação da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal—Bionorte, Manaus, Amazonas, Brazil

²Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

³Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado, Manaus, Amazonas, Brazil

⁴Universidade Estadual do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

⁵Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, Brazil

Correspondence should be addressed to Adrian Martin Pohlit; adrian.pohlit@gmail.com

Received 8 November 2018; Revised 5 December 2018; Accepted 17 December 2018; Published 22 January 2019

Academic Editor: Giuseppe Comi

Copyright © 2019 Kátia Santana Cruz et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background. Cryptococcosis is a fungal disease of bad prognosis due to its pathogenicity and the toxicity of the drugs used for its treatment. The aim of this study was to investigate the medicinal potential of carbazole and β -carboline alkaloids and derivatives against *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*. **Methods.** MICs were established in accordance with the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute for alkaloids and derivatives against *C. neoformans* and *C. gattii* genotypes VNI and VGI, respectively. A single active compound was further evaluated against *C. neoformans* genotypes VNII, VNIII, and VNIV, *C. gattii* genotypes VGI, VGIII, and VGIV, *Candida albicans* ATCC 36232, for cytotoxicity against the MRC-5 lineage of human fibroblasts and for effects on fungal cells (cell wall, ergosterol, and leakage of nucleic acids). **Results.** Screening of 11 compounds revealed 8-nitroharmane as a significant inhibitor (MIC 40 μ g/mL) of several *C. neoformans* and *C. gattii* genotypes. It was not toxic to fibroblasts (IC₅₀ > 50 μ g/mL) nor did it alter fungal cell walls or the concentration of ergosterol in *C. albicans* or *C. neoformans*. It increased leakage of substances that absorb at 260 nm. **Conclusions.** The synthetic β -carboline 8-nitroharmane significantly inhibits pathogenic *Cryptococcus* species and is interesting as a lead compound towards new therapy for *Cryptococcus* infections.

1. Introduction

Cryptococcosis, a fungal disease caused by *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*, occurs predominantly in immunocompromised individuals. *Cryptococcus* infections occur through inhalation of blastospores and basidiospores that establish a pulmonary infection. These infections can also disseminate to the meninges and brain, causing meningitis or meningoencephalitis [1]. The global incidence and impact of cryptococcosis (cryptococcal disease) is estimated to be 624,700 deaths annually, with a broad confidence interval of 125,000 to 1,124,900 [2].

For cryptococcosis treatment, the World Health Organization (WHO) recommends a two-week course of amphotericin B and flucytosine (5-FC) as the initial intensive induction phase and subsequently followed by a step-down to fluconazole for the consolidation and monitoring phases of treatment for cryptococcal meningitis [3]. The arsenal of treatment options available presently for management is limited, with no new class of antifungal agent exhibiting cryptococcal activity licensed in almost 30 years [4]. Treatment failure and drug toxicity are frequently observed, and the search for potential drugs for therapy is necessary [5].

Previous work has shown that harman alkaloids (Table 1) and related β -carbolines (β Cs) exhibit important antifungal properties. Harmol is fungicidal to *Botrytis cinerea* and fungistatic to *Penicillium digitatum* affecting conidia membrane permeabilization in both species [6]. Harmane selectively inhibited *Cercospora arachidicola* while its synthetic derivative 8-nitroharmane strongly inhibited 13 out of 14 fungi species tested [7]. A variety of synthetic β C analogs have recently been patented as fungicides for the treatment of plant diseases [8]. Of medicinal relevance, harmane [9] and harmine [10] are reported to be potent *Candida albicans* inhibitors and harmine in binary combinations with other β Cs strongly inhibits *Aspergillus niger*. Harmaline significantly inhibits *Candida rugosa* lipase *in vitro* as a competitive inhibitor according to *in silico* (docking) studies [11]. A recent patent describes the enhancement by harmine hydrochloride of the action of fluconazole against drug-resistant *C. albicans* in compositions that claim to reverse resistance to fluconazole [12]. These and other examples attest to the potential of harman β Cs of natural or synthetic origin as antifungal agents for medicinal and other applications.

To our knowledge, harman alkaloids or their derivatives have not been previously assayed against *Cryptococcus* spp. The aim of this study was to evaluate the antifungal activity of carbazoles and β Cs against the clinically relevant species *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*.

2. Materials and Methods

2.1. Microorganisms and Reference Strain. Eight lyophilized standard culture strains of *C. neoformans* (WM148/08; WM626/08; WM628/08; WM629/08) and *C. gattii* (WM179/08; WM178/08; WM179/08; WM779/08) were kindly provided by the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz) in Rio de Janeiro, Brazil. *Candida albicans* strain ATCC 36232 from the culture collection at the National Institute for Amazonian Research (INPA) in Manaus, Amazonas state, Brazil, was used as reference.

The strains were reactivated in Sabouraud agar dextrose (SAD). An inoculum was removed from the SAD culture and suspended in 5.0 mL of sterile 0.085% saline water and vortexed for 15 s. The cell density was adjusted to 0.5 on the McFarland scale (comparison to reference).

2.2. Substances. Eleven commercial and synthetic carbazole and β -carboline derivatives (Table 1) were screened in this work. Prior to testing, substances were diluted in 1% dimethyl sulfoxide (DMSO) to 1.28 mg/mL (stock solution).

2.3. Antifungal Susceptibility. Minimum inhibitory concentration (MIC) assays were performed with the broth microdilution method, as described by the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) in documents M27-A3/CLSI [13]. Briefly, 100 μ L of each evaluated compound diluted in RPMI 1640 broth was added to 96-well microplates, with the final concentrations of the compounds ranging from 300 to 0.0622 μ g/mL (tested substances) and from 32 to

0.065 μ g/mL (amphotericin B, antifungal standard). Next, 100 μ L of an inoculum containing 2.5×10^3 cells/mL of the reference microorganism was added to 96-well microplates. The microdilution plates were incubated at room temperature (35°C) for 24 to 48 h for *Candida* sp. and *Cryptococcus* spp., respectively. The amount of growth in the tubes containing the tested substance is compared visually with the amount of growth in the growth-control tubes (no antifungal agent) used in each set of tests. In the present work, MIC was defined as the concentration that causes >50% reduction in the growth relative to the drug-free growth control.

2.4. Cytotoxicity Assay. The MRC-5 (ATCC-CCL-171-fibroblast/tissue: lung/disease: normal) cell lines were grown in Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% bovine fetal serum, 2 mmol·L⁻¹ glutamine, 100 μ g/mL streptomycin, and 100 U/mL penicillin and incubated at 37°C with a 5% atmosphere of CO₂ for 24 h. The substances were individually dissolved in DMSO and added to each well (final concentrations of 0.781–50 μ g/mL) and incubated for 72 h. Doxorubicin (5 μ g/mL) was used as positive control. Negative controls (blanks) received the same amount of DMSO and had the same final DMSO concentrations as the samples (0.1%). Two hours prior to the end of incubation, 10 μ L of AlamarBlue® cell viability reagent was added to each well. The fluorescent signal was monitored with a multiplate reader using a 530–560 nm excitation wavelength range and 590 nm emission wavelength. The fluorescent signal generated from the assay was proportional to the number of living cells in the sample, according to the specifications of the manufacturer [14].

2.5. Mechanism of Action Assays. The antifungal mechanism of action of 8-nitroharmane was evaluated using the yeast *C. neoformans* VNI WM148/08 and *C. albicans* strain ATCC 36232 as a model. The influence of 8-nitroharmane on the cell wall (sorbitol protection assay), effect of ergosterol on the cell membrane (ergosterol effect assay), and leakage of substances absorbing at 260 nm were evaluated as described:

2.5.1. Sorbitol Protection Assay. The MIC of 8-nitroharmane was determined against *C. neoformans* VNI and *C. albicans* ATCC 36232 (from 320 to 0.20 μ g/mL) in the presence and absence of 0.8 M sorbitol (Sigma-Aldrich) [15, 16]. The MICs were determined after 24 and 72 h of incubation at 35°C.

2.5.2. Ergosterol Effect Assay. The MICs of 8-nitroharmane were determined against *C. neoformans* VNI and *C. albicans* ATCC 36232 (from 320 to 0.20 μ g/mL) in the presence (200–800 μ g/mL) and absence of exogenous ergosterol (Sigma-Aldrich) [16, 17]. Amphotericin B was used as a control. The MICs were determined after 24 and 72 h of incubation at 35°C. A substance that has affinity for ergosterol rapidly forms complexes with free ergosterol, thus

TABLE 1: Names, IUPAC nomenclature, and structures of carbazole and β -carboline compounds.

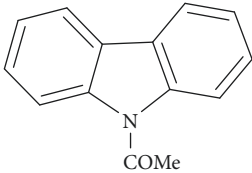
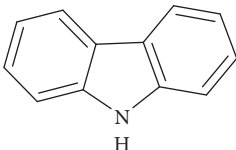
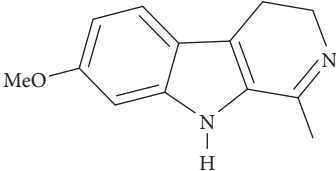
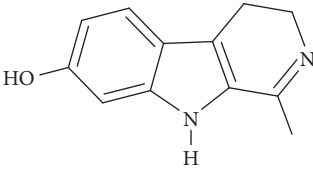
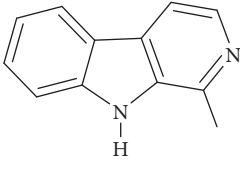
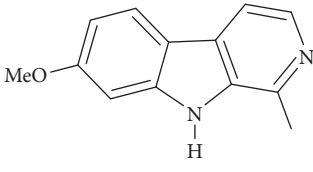
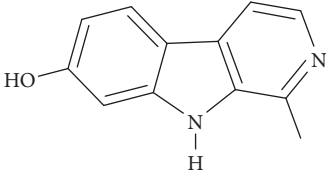
Substance name	Structures	IUPAC name
<i>N</i> -acetyl-9H-carbazole		<i>N</i> -acetyl-carbazole
9H-carbazole		9H-carbazole
Harmaline		7-Methoxy-1-methyl-4,9-dihydro-3H-pyrido[3,4-b]indole
Harmalol		1-Methyl-4,9-dihydro-3H- β -carboline-7-ol
Harmane		1-Methyl-9H-pyrido[3,4-b]indole
Harmine		7-Methoxy-1-methyl-9H-pyrido[3,4-b]indole
Harmol		1-Methyl-2,9-dihydropyrido[3,4-b]indol-7-one

TABLE 1: Continued.

Substance name	Structures	IUPAC name
6-Nitroharmane		6-Nitro-1-methyl-9H-pyrido[3,4-b]indole
8-Nitroharmane		8-Nitro-1-methyl-9H-pyrido[3,4-b]indole
6-Nitroharmine		7-Methoxy-6-nitro-1-methyl-9H-pyrido[3,4-b]indole
8-Nitroharmine		7-Methoxy-8-nitro-1-methyl-9H-pyrido[3,4-b]indole

preventing interactions with ergosterol in the fungal membrane; as a result, the MIC of the tested substance increases in the presence of ergosterol [18].

2.5.3. Test for Leakage of Substances Absorbing at 260 nm. *C. neoformans* VNI and *C. albicans* ATCC 36232 were grown in a shaker at 35°C until the early stationary phase (18 h of growth). After incubation, the cells were washed and resuspended in MOPS buffer (0.16 M, pH 7.0). An inoculum of 5×10^4 cells/mL was transferred to microtubes (final volume 500 μ L) containing $1 \times$ or 4 MIC of 8-nitroharmane and incubated at 37°C. After 1, 2, 4, or 6 h of incubation, the microtubes were centrifuged (5 min at 3,000 rpm), and the absorbance of the supernatants (100 μ L) was measured at 260 nm (Gene Quant DNA/RNA Eppendorf). The absorbance due to leakage from cells treated with HClO_4 (1.2 M, 100°C, 30 min) was considered 100% [16, 19].

2.6. Statistical Analysis. All the values reported in Tables 2–6 are averages of replicate experiments. In general, for a given concentration of a sample or control in the procedures above, replicates had the same experimental value (no variation).

3. Results

3.1. Screening of Compounds for Anticryptococcal Activity. Of the 11 carbazoles and β -carbolines screened, only 8-nitroharmane exhibited significant activity ($<50 \mu\text{g/mL}$) against *Cryptococcus gattii* VGII and *C. neoformans* VNI (Table 2).

Subsequently, the effects of 8-nitroharmane were investigated on a variety of genotypes of the *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* species complex (Table 3). This compound further exhibited important inhibition (MIC = $40 \mu\text{g/mL}$) of genotypes VNIII and VNIV of *C. neoformans* and the genotype VGIII of *C. gattii*.

3.2. Cytotoxicity/Viability Assay. 8-nitroharmane did not affect viability of normal human (MRC-5) fibroblasts ($\text{IC}_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$) after 24 h of exposure. The cytotoxic standard doxorubicin exhibited $\text{IC}_{50} = 0.34$ (0.27–0.43) $\mu\text{g/mL}$.

3.3. Mechanism of Action Assays

3.3.1. Action on the Cell Wall. A sorbitol protection assay was conducted to determine the influence of 8-nitroharmane on

TABLE 2: MIC of carbazole and β -carboline derivatives against *Cryptococcus gattii* and *C. neoformans* strains.

Substances	<i>C. gattii</i> VGII WM178/08 MIC ($\mu\text{g/mL}$)	<i>C. neoformans</i> VNI WM148/08 MIC ($\mu\text{g/mL}$)
8-Nitroharmane	40	40
9H-carbazole	160	160
Harmane	160	160
8-Nitroharmine	160	160
N-Acetyl-9H-carbazole	>320	>320
Harmaline	>320	>320
Harmalol	>320	>320
Harmine	>320	>320
Harmol	>320	>320
6-Nitroharmane	>320	>320
6-Nitroharmine	>320	>320
Amphotericin B	0.250	0.065

TABLE 3: MICs of 8-nitroharmane against genotypes of the *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* complex.

Species/molecular types	8-Nitroharmane MIC ($\mu\text{g/mL}$)	Amphotericin B MIC ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Candida albicans</i> ATCC 36232	160	0.5
<i>C. gattii</i> VGI WM178/08	80	0.25
<i>C. gattii</i> VGIII WM179/08	40	0.25
<i>C. gattii</i> VGIV WM779/08	160	0.25
<i>C. neoformans</i> VNII WM626/08	80	0.25
<i>C. neoformans</i> VNIII WM628/08	40	0.125
<i>C. neoformans</i> VNIV WM629/08	40	0.125

the integrity of the fungal cell wall. In this assay, MIC determinations of 8-nitroharmane against *Cryptococcus neoformans* VNI and *Candida albicans* ATCC 36232 were carried out in parallel in the presence and absence of sorbitol (0.8M), which is an osmotic protectant used for the stabilization of fungal protoplasts. A substance that interferes negatively with the fungal cell wall will shift the MIC to a higher value in the presence of osmotic support [15]. The MIC of 8-nitroharmane did not change in the presence of sorbitol after 72 h of incubation (Table 4). This is evidence that 8-nitroharmane does not inhibit *Cryptococcus* spp. by interfering with cell walls.

3.3.2. Action on Ergosterol. The ergosterol assay was used to determine whether 8-nitroharmane induces changes in the fungal membrane by interacting with ergosterol. This assay has been shown to identify substances that bind ergosterol in fungal membranes and is based on the addition of exogenous ergosterol. The MIC of 8-nitroharmane did not change in the presence of different concentrations (400 to 1600 $\mu\text{g/mL}$) of exogenous ergosterol (Table 5). Thus, 8-nitroharmane's inhibition of *Cryptococcus* spp. does not involve interaction with ergosterol. In contrast, a 4-fold increase in the MIC of amphotericin B was observed which is consistent with the strong affinity for ergosterol associated with this substance.

3.3.3. Leakage of Substances Absorbing at 260 nm. The interference of 8-nitroharmane was determined by evaluating the leakage of substances that absorb at 260 nm. Membrane rupture causes the release/leakage of intracellular

components from the fungal cell that can then be measured. Nucleotides, which exhibit a strong absorbance at 260 nm, are among the components that can be monitored to detect leakage. 8-nitroharmane (1 $\times$ MIC and 4 $\times$ MIC) was added to cell suspensions of *C. albicans* and *Cryptococcus neoformans* VNI, and the samples were examined after various time intervals (1, 2, 4, and 6 h). 1 $\times$ MIC of 8-nitroharmane caused 6, 9, 17, and 21% increases in cell leakage after 1, 2, 4, and 6 h, respectively, compared to the perchloric acid control (Table 6). Furthermore, the 4 $\times$ MIC treatment caused a 2.6 $\times$ increase in nucleotide leakage, resulting in 14, 25, 42, and 61% increases in leakage after 1, 2, 4, and 6 h, respectively, compared to perchloric acid (100% cell leakage, control).

4. Discussion

Harmine, harmaline, and related β Cs are collectively known as harmala alkaloids and were first found in the *Peganum harmala* plant which has many medicinal uses, including the treatment of fungal infections [20]. Harmine and harmaline (isolated from *P. harmala*), harmol, harmalol, tetrahydroharmane, and tetrahydroharmol (synthesized from harmine and harmaline) have been screened previously for antifungal activity against 8 dermatophytes, 6 filamentous fungi, and 2 *Candida* spp. [21]. In that work, with the exception of discreet activity against dermatophytes by harmine, the remainder of these compounds were inactive against fungi (MIC > 500 $\mu\text{g/mL}$). Also according to that work, harmine exhibited MICs of 50 $\mu\text{g/mL}$ against *Trichophyton tonsurans*, 75 $\mu\text{g/mL}$ against *Epidermophyton*

TABLE 4: Effect of 0.8 M sorbitol on the MIC of 8-nitroharmane against *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*.

Substances	<i>C. neoformans</i> VNI WM148/08 MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		<i>C. albicans</i> ATCC 36232 MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	No sorbitol	0.8 M sorbitol	No sorbitol	0.8 M sorbitol
8-Nitroharmane	40	40	160	160
Amphotericin B	0.065	0.065	0.5	0.5

TABLE 5: Effect of exogenous ergosterol (400–1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on the MIC of 8-nitroharmane against *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*.

Substances	<i>C. neoformans</i> VNI WM148/08 MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)				<i>C. albicans</i> ATCC 36232 MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
	Control	Ergosterol ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			Control	Ergosterol ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
	0	400	800	1600	0	400	800	1600
8-Nitroharmane	40	40	40	40	160	160	160	160
Amphotericin B	0.065	0.065	0.250	0.500	0.5	0.5	1.0	2.0

TABLE 6: Percent leakage of substances absorbing at 260 nm from *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* induced by 8-nitroharmane.

Percent (%) leakage of substances absorbing at 260 nm									
Substances (concentration)	<i>C. neoformans</i> VNI WM148/08				Substances (concentration)	<i>C. albicans</i> ATCC 36232			
	1 h	2 h	4 h	6 h		1 h	2 h	4 h	6 h
8-Nitroharmane (40 µg/mL)	0	10	30	60	8-Nitroharmane (160 µg/mL)	0	10	30	60
8-Nitroharmane (320 µg/mL)	10	40	50	60	8-Nitroharmane (640 µg/mL)	10	40	50	60
HClO ₄ (1.2 M)	100	100	100	100	HClO ₄ (1.2 M)	10	100	100	100
Control (blank)	0	0	0	0	Control (blank)	0	0	0	0

floccosum, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against *Microsporum canis* and 5 other *Trichophyton* spp. Substances with antifungal properties and with MIC < 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ have been suggested as good antifungal agents [22]. Also, as presented in the introduction, harmaline [9] and harmine [10] are reported to be potent inhibitors of *Candida albicans*.

To our knowledge, the present study is the first to screen harmala alkaloids, carbazoles, and their derivatives for activity against *Cryptococcus* spp. Herein, no significant inhibitory activity was observed for harmaline, harmine, harmol, or harmalol against *Cryptococcus* spp. (MIC $\geq$ 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in contrast to the activity of these compounds against other fungi according to previous studies presented above. Herein, a new synthetic compound, 8-nitroharmane, that exhibits important inhibition (MIC = 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of genotypes VNI, VNIII, and VNIV of *C. neoformans* and genotypes VGII and VGIII of *C. gattii* was revealed.

Toxicity is an important factor to be investigated as part of prospecting for new active substances [23]. Concentration-response tests performed with human cells have been increasingly used in the screening of new active substances [24–26]. In experimental conditions herein, 8-nitroharmane did not inhibit normal human cell (MRC-5 fibroblast) cultures even at the highest concentration tested (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and thus is not cytotoxic [15].

The mode of action of the inhibition of *C. neoformans* and *C. gattii* by 8-nitroharmane was investigated through preliminary testing. This compound was shown neither to

act on the cell wall (there was no difference in MIC in the presence or absence of the osmotic protectant sorbitol) nor on ergosterol (there was no difference in MIC in the presence or absence of extracellular ergosterol). However, 8-nitroharmane acted in the extracellular overflow of nucleotides demonstrated by the leakage of nucleic acids from the intracellular medium.

The anticryptococcosis potential of 8-nitroharmane demonstrated in the present work is important. According to the WHO, cryptococcosis should be treated with amphotericin B associated with flucytosine and the fluconazole should be used as a drug of consolidation [3, 27]. However, amphotericin B presents nephrotoxicity in the long-term treatments common to HIV patients. Furthermore, the causal agents of cryptococcosis have demonstrated resistance to azoles such as fluconazole. It is paramount to seek new substances with less adverse effects and tolerable to patients with cryptococcosis [27].

The investigation of new substances with activity against cryptococcosis is important as the current therapeutic arsenal has adverse effects and high toxicity. Other equally toxic medications and the conjugation of this therapy are difficult for patient's tolerance. Herein, the potential of semisynthetic substances derived from β -carboline as antifungal agents was demonstrated.

In the present work, 8-nitroharmane was evaluated against *C. neoformans*, *C. gattii*, and *C. albicans*. In the future work, this compound and more synthetic βC derivatives and analogs should be screened against these same as well as

other pathogenic *Cryptococcus* spp. Synergistic effects should also be investigated by combining these compounds and in combinations with known fungicides such as amphotericin B or fluconazole against *Cryptococcus* spp. Also, the toxicity of 8-nitroharmane and other β Cs to other normal human cell lines should be evaluated as a means to ascertain possible cytotoxic effects not observed in fibroblasts. Further mechanistic studies should be performed to try to ascertain the molecular basis and possible existence of other modes of action. Also, the potential of 8-nitroharmane and other derivatives of harmala alkaloids (β Cs) should be evaluated in *in vivo* models of *Cryptococcus* infection as a means to test ethnopharmacological knowledge in systems where metabolism (such as cytochrome P450, known to readily hydroxylate β -carbolines) and other interactions with the host may be relevant.

5. Conclusion

This work provides a robust account of the screening of eleven substances against two *Cryptococcus* pathogenic species as well as the evaluation of 8-nitroharmane against 8 different genotypes of agents of cryptococcosis. Also, the most active compound 8-nitroharmane exhibited low cellular toxicity to one of the most widely used cell cultures in the literature (MCR-5).

Abbreviations

ATCC: American Type Culture Collection
MIC: Minimum inhibitory concentration
SAD: Sabouraud agar dextrose
DMSO: Dimethyl sulfoxide
MOPS: 4-Morpholinepropanesulfonic acid
NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards
RPMI: Roswell Park Memorial Institute

Data Availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Consent

All data published herein are under the consent for publication.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Authors' Contributions

KSC and JVBS conceived the study and participated in its design and coordination. AM, and AMP prepared/purified several β Cs and checked the purity of all compounds. KSC, ESL, and MJAS carried out the cytotoxicity assay. KSC wrote the first draft of the manuscript. ESS raised useful suggestions and made critical comments. AMP, JVBS, and KSC

wrote the later and final drafts, and all the authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We thank Dr. Ani Beatriz Jackisch Matsuura for kindly providing the *Cryptococcus* samples for this study. We recognize support from FAPEAM, CNPq, and CAPES (Pró-Amazônia 2012, N.47). AMP would like to recognize funding received from CNPq (PQ bursary, Universal 2014) and FAPEAM (PRONEX). JVBS recognizes support received from CAPES (Pró-Amazônia 2012, N.47). AMP recognizes support received from CNPq (461971/2014-3) and FAPEAM (PRONEX, 23/2009).

References

- [1] C.-Y. Kuo, S.-Y. Wang, H.-P. Shih et al., "Disseminated cryptococcosis due to anti-granulocyte-macrophage colony-stimulating factor Autoantibodies in the absence of pulmonary alveolar proteinosis," *Journal of Clinical Immunology*, vol. 37, no. 2, pp. 143–152, 2016.
- [2] A. Idnurm and X. Lin, "Rising to the challenge of multiple *Cryptococcus* species and the diseases they cause," *Fungal Genetics and Biology*, vol. 78, pp. 1–6, 2015.
- [3] J. R. Perfect, W. E. Dismukes, F. Dromer et al., "Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of America," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 50, no. 3, pp. 291–322, 2010.
- [4] J. A. O'Halloran, W. G. Powderly, and A. Spec, "Cryptococcosis today: it is not all about HIV infection," *Current Clinical Microbiology Reports*, vol. 4, no. 2, pp. 88–95, 2017.
- [5] K. Niemirowicz, B. Durnaś, E. Piktel, and R. Bucki, "Development of antifungal therapies using nanomaterials," *Nanomedicine*, vol. 12, no. 15, pp. 1891–1905, 2017.
- [6] F. M. Cabrerizo, G. M. Olmedo, L. Cerioni, M. M. Gonz, V. A. Rapisarda, and S. I. Volentini, "Antifungal activity of β -carbolines on *Penicillium digitatum* and *Botrytis cinerea*," *Food Microbiology*, vol. 62, pp. 9–14, 2017.
- [7] H. Song, Y. Liu, Y. Liu, L. Wang, and Q. Wang, "Synthesis and antiviral and fungicidal activity evaluation of β -carboline, dihydro- β -carboline, tetrahydro- β -carboline alkaloids, and their derivatives," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 62, no. 5, pp. 1010–1018, 2014.
- [8] Q. Wang, H. Song, Y. Liu, and Y. Liu, " β -Carboline, dihydro- β -carboline and tetrahydro- β -carboline alkaloid derivatives as plant antiviral agents, fungicides and insecticides and their preparation, agricultural compositions and use in the treatment diseases," US Patent 0326166A1, 2016.
- [9] V. R. M. Reza and H. Abbas, "Cytotoxicity and antimicrobial activity of harmala alkaloids," *Journal of Pharmacology and Toxicology*, vol. 2, no. 7, pp. 677–680, 2007.
- [10] G. Nenaah, "Antibacterial and antifungal activities of (beta)-carboline alkaloids of *Peganum harmala* (L) seeds and their combination effects," *Fitoterapia*, vol. 81, no. 7, pp. 779–782, 2010.
- [11] K. Benarous, I. Bombarda, I. Iriepa et al., "Harmaline and hispidin from *Peganum harmala* and *Inonotus hispidus* with binding affinity to *Candida rugosa* lipase: in silico and in vitro studies," *Bioorganic Chemistry*, vol. 62, pp. 1–7, 2015.
- [12] X. Li, L. Hao, and X. Wu, "Anti-*Candida albicans* product containing harmine hydrochloride and fluconazole and its

- application in preparation of antifungal product,” Chinese Patent 107519167, 2017.
- [13] J. H. Rex, B. D. Alexander, D. Andes et al., *Reference Method For Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard*, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 3rd edition, 2008.
 - [14] G. R. Nakayama, M. C. Caton, M. P. Nova, and Z. Parandoosh, “Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro,” *Journal of Immunological Methods*, vol. 204, no. 2, pp. 205–208, 1997.
 - [15] D. J. Frost, K. D. Brandt, D. Cugier, and R. Goldman, “A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors fungal cell wall synthesis and assembly,” *Journal of Antibiotics*, vol. 48, no. 4, pp. 306–310, 1995.
 - [16] M. D. P. S. B. Ferreira, M. F. D. Cardoso, F. D. da Silva, V. Ferreira, E. Lima, and J. V. Souza, “Antifungal activity of synthetic naphthoquinones against dermatophytes and opportunistic fungi: preliminary mechanism-of-action tests,” *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, vol. 13, no. 1, p. 26, 2014.
 - [17] A. Escalante, M. Gattuso, P. Pérez, and S. Zacchino, “Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman,” *Journal of Natural Products*, vol. 71, no. 10, pp. 1720–1725, 2008.
 - [18] C. S. Lunde and I. Kubo, “Effect of polygodial on the mitochondrial ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 44, no. 7, pp. 1943–1953, 2000.
 - [19] H. Carrasco, M. Raimondi, L. Svetaz et al., “Antifungal activity of eugenol analogues. Influence of different substituents and studies on mechanism of action,” *Molecules*, vol. 17, no. 1, pp. 1002–1024, 2012.
 - [20] T. Herraiz, D. González, C. Ancín-Azpilicueta, V. J. Arán, and H. Guillén, “ β -Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO),” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 48, no. 3, pp. 839–845, 2010.
 - [21] A. Ahmad, K. Ali Khan, S. Sultana et al., “Study of the in vitro antimicrobial activity of harmine, harmaline and their derivatives,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 35, no. 3, pp. 289–294, 1992.
 - [22] P. Vandeputte, S. Ferrari, and A. T. Coste, “Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections,” *International Journal of Microbiology*, vol. 2012, Article ID 713687, 26 pages, 2012.
 - [23] L. Guzzetti, A. Galimberti, I. Bruni et al., “Bioprospecting on invasive plant species to prevent seed dispersal,” *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, pp. 1–11, 2017.
 - [24] F. Mietton, E. Ferri, M. Champeboux et al., “Selective BET bromodomain inhibition as an antifungal therapeutic strategy,” *Nature Communications*, vol. 8, p. 15482, 2017.
 - [25] C. Zani, F. Bisceglie, F. M. Restivo et al., “A battery of assays as an integrated approach to evaluate fungal and mycotoxin inhibition properties and cytotoxic/genotoxic side-effects for the prioritization in the screening of thiosemicarbazone derivatives,” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 105, pp. 498–505, 2017.
 - [26] A. Johns, D. H. Scharf, F. Gsaller et al., “A nonredundant phosphopantetheinyl transferase, PptA, is a novel antifungal target that directs secondary metabolite, siderophore, and lysine biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* and is critical for pathogenicity,” *mBio*, vol. 8, no. 4, pp. 1–22, 2017.
 - [27] J. R. Perfect, “The antifungal pipeline: a reality check,” *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 16, no. 9, pp. 603–616, 2017.

