UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

THAISA CRISTINA SILVA

ATIVIDADE DA PUNICALAGINA EM LEVEDURAS DO COMPLEXO *Cryptococcus neoformans* E DE ESPÉCIES DE *Candida*

Goiânia
2017

sistema de bibliotecas ufg

PRPG
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO

UFG

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **[ ] Dissertação** **[X] Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: **Thaísa Cristina Silva**

Título do trabalho: **Atividade da punicalagina em leveduras do Complexo *Cryptococcus neoformans* e de espécies de *Candida***

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento [**X**] SIM [ ] NÃO[1]

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Thaísa Cristina Silva

Assinatura da autora[2]
Thaísa Cristina Silva

Ciente e de acordo:

Assinatura da orientadora[2]

Data: 12 / 09 / 2017

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.
Casos de embargo:
- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

[2] A assinatura deve ser escaneada.

Versão atualizada em maio de 2017.

THAÍSA CRISTINA SILVA

ATIVIDADE DA PUNICALAGINA EM LEVEDURAS DO COMPLEXO *Cryptococcus neoformans* E DE ESPÉCIES DE *Candida*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, para obtenção do Título de Doutora em Medicina Tropical e Saúde Pública, Área de Concentração Microbiologia.

Orientadora: Profª. Dra. Maria do Rosário Rodrigues Silva

Goiânia
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Silva, Thaísa Cristina
Atividade da punicalagina em leveduras do Complexo Cryptococcus neoformans e de espécies de Candida [manuscrito] / Thaísa Cristina Silva, Maria do Rosário Rodrigues Silva. - 2017.
xviii, 109 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Maria do Rosário Rodrigues Silva.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2017.
Bibliografia. Anexos. Apêndice.
Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Micologia. 2. Candida. 3. Complexo Cryptococcus neoformans. 4. Punicalagina. 5. Antifúngicos. I. Silva, Maria do Rosário Rodrigues. II. Silva, Maria do Rosário Rodrigues, orient. III. Título.

CDU 582.28

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
Rua 235, s/n – Setor Universitário - Goiânia/GO – CEP: 74.605-050
Fones: (62) 3209.6362 - 3209.6102 – Fax: (62) 3209.6363 - e-mail : ppgmtsp.ufg@gmail.com

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE THAÍSA CRISTINA SILVA - Aos doze dias do mês de setembro do ano de 2017 (12/09/2017), às 9:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profas. Dras. MARIA DO ROSÁRIO RODRIGUES SILVA, VALÉRIA DE OLIVEIRA, LAILA SALMEN ESPÍNDOLA, CAROLINA RODRIGUES COSTA e MARIA TERESA FREITAS BARA, para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: **"ATIVIDADE BIOLÓGICA DA PUNICALAGINA SOBRE LEVEDURAS DO COMPLEXO *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* E DE ESPÉCIES DE *CANDIDA*"** em nível de **DOUTORADO**, área de concentração em **MICROBIOLOGIA**, de autoria de **THAÍSA CRISTINA SILVA** discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora Profa. Dra. MARIA DO ROSÁRIO RODRIGUES SILVA, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da tese que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca argüiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Terminada a fase de argüição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1034/2014 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata **Aprovada** ou **Reprovada**:

Banca Examinadora	**Aprovada / Reprovada**
Profa. Dra. Maria do Rosário Rodrigues Silva	Aprovada
Profa. Dra. Valéria de Oliveira	Aprovada
Profa. Dra. Laila Salmen Espíndola	Aprovado
Profa. Dra. Carolina Rodrigues Costa	Aprovada
Profa. Dra. Maria Teresa Freitas Bara	Aprovada

CONFERE C/ ORIGINAL
José Clementino de Oliveira Neto
Assistente em Administração
Pós-Graduação/IPTSP/UFG

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata Habilitada, (**Habilitada ou não Habilitada**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **DOUTOR EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**, na área de concentração em **MICROBIOLOGIA**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 12h 30min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, JOSÉ CLEMENTINO DE OLIVEIRA NETO, secretário do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.
A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Tese:

Atividade de punicalagina em leveduras do complexo *Cryptococcus neoformans* e espécies de *Candida*.

Profa. Dra. Maria do Rosário Rodrigues Silva (IPTSP/UFG) MRRSilva
Profa. Dra. Valéria de Oliveira (FF/UFG) Valéria de Oliveira
Profa. Dra. Laila Salmen Espíndola (UnB/DF) Laila S. Espindola
Profa. Dra. Carolina Rodrigues Costa (IPTSP/UFG) Carolina R. Costa
Profa. Dra. Maria Teresa Freitas Bara (FF/UFG) Maria Teresa F Bara
Secretário da Pós-Graduação:

*Dedico à minha **família**, especialmente aos meus pais.*

"A virtude é a própria recompensa. Se você fizer só o que sabe, nunca será mais do que é."

Autor desconhecido

AGRADECIMENTOS

A Deus por renovar diariamente as minhas forças, aumentar a minha fé e nunca permitir que eu desista!

À minha orientadora Profa. Dra. Maria do Rosário Rodrigues Silva, por todo apoio, confiança e compreensão durante a nossa convivência, e por sempre estimular meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada por todo carinho, respeito, atenção e amizade dedicados a mim durante esta jornada. Por me ensinar a ser uma pessoa melhor e permitir a concretização de meus ideais.

Às professoras do laboratório de micologia Dra. Carolina Rodrigues Costa, Dra. Lúcia Kioko Hasimoto e Souza e Dra. Orionalda Lisboa, meus sinceros agradecimentos por todos estes anos de convivência e aprendizado.

À Profa. Dra. Maria Teresa Freitas Bara da Faculdade de Farmácia da UFG, por ceder gentilmente o composto punicalagina para este estudo.

Ao Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos (LCQM da FF-UFG), em especial Jerônimo e Elviscley, pelo auxílio com o espectrofotômetro de varredura.

À Profa. Dra. Marize Campos Valadares, do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular (LFTC/FARMATEC) da Faculdade de Farmácia da UFG, pela oportunidade de aprendizado e de realização de ensaios laboratoriais imprescindíveis para o desenvolvimento da tese. Aos alunos do LFTC/FARMATEC, Wanessa e Arthur pelo auxílio na realização da técnica de citotoxicidade. E ao aluno Renato Ivan pela disponibilidade, dedicação e interesse ao me ajudar em todas as etapas de realização dos ensaios de citometria e de citotoxicidade.

Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic) do Instituto de Física da UFG e especialmente a técnica Tatiane Oliveira dos Santos por ajudar na realização do ensaio de microscopia eletrônica com tanta disponibilidade e dedicação.

Aos professores do Instituto de Ciências Biológicas (ICB/UFG) Dr. Pedro Brito, Dra. Fernanda Cristina Alcântara dos Santos e Dra. Walquíria Arruda por toda ajuda com a microscopia eletrônica, desde o preparo das amostras, até a análise do resultado.

Aos colegas do laboratório de micologia: Andressa, Viviane, Lucas, Fernanda, Nathany, Rayssa, Hildene, Maysa e Cícero pelos bons momentos de descontração, apoio e amizade.

Aos amigos Fábio Silvestre, Ana Flávia Mendonça e Carolina Treméa que já se desligaram dos programas de pós-graduação, mas permanecem na minha vida, seja, esclarecendo dúvidas ou compartilhando bons momentos.

À minha amada amiga Ana Laura pelas infinitas ajudas em todos os aspectos da minha vida. Obrigada amiga por toda ajuda acadêmica, isso inclui auxílios nas formatações, revisões, redações, opiniões e estatísticas. Por acreditar tanto em mim e me impulsionar a buscar o melhor sempre. Obrigada pelos anos de convivência e companheirismo, por tornar essa vida acadêmica mais leve e feliz!

À Fabyola Amaral, por compartilhar comigo seus conhecimentos, me acolher e ajudar na parte experimental e em todas as outras vezes que eu precisei, me aconselhando e incentivando com carinho e dedicação.

Ao Programa de pós-graduação do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (Iptsp) da UFG pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional e, aos queridos servidores Zezinho e Kariny pelo apoio e auxílios durantes esses anos de convivência.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

Agradeço de forma especial à minha prima Bruna, que esteve ao meu lado nessa fase tão importante da minha vida.

Por fim, agradeço aos meus pais, à minha irmã e ao meu afilhado João Vitor, pelo amor incondicional.

FIGURAS, TABELAS, ANEXOS E APÊNDICE

Figura 1 -Processo de infecção de *C. gattii* (esquerda) e *C. neoformans* (direita). A infecção começa após inalação dos propágulos, que chegam aos pulmões. *C. neoformans* e *C. gattii* se diferenciam pelas condições imunológicas, órgão de preferência do hospedeiro e origem dos propágulos. 3

Figura 2 - Classificação dos compostos fenólicos 11

Figura 3 - Estrutura química da punicalagina 12

Figura 4 - Etapas de procedimento do teste de microdiluição em caldo segundo metodologia padronizada para leveduras proposta pelo CLSI (2008, 2012). 19

Figura 5 - Representação esquemática dos grupos de tratamento com punicalagina e anfotericina B em placa de 96 orifícios para ensaio de citotoxicidade em células Balb/c 3T3. A cor cinza claro representa os orifícios tratados com punicalagina em diferentes concentrações e a cor cinza escuro representa os orifícios tratados com anfotericina B. BC: branco do controle (meio DMEM e SFB); BP: Branco (controle de punicalagina) e BA: Branco (controle de anfotericina B). Controle: meio contendo células Balb/c 3T3. 28

Figura 6- Representação esquemática dos grupos de tratamento com punicalagina e anfotericina B em placa de 96 orifícios para ensaio hemolítico. Tratamento A, cor cinza claro representa os orifícios tratados com punicalagina e a cor cinza escuro representa os orifícios tratados com anfotericina B. BC: branco do controle (Triton X-100); BP: branco (controle de punicalagina); BA: branco (controle de anfotericina B). 31

Figura 7- Curva de crescimento de *C. gattii* ATCC 24065 (A) e *C. neoformans* ATCC 28957 (B) sem tratamento e tratadas com punicalagina no valor correspondente a metade da concentração inibitória mínima (0,25 μg/mL), CIM (0,5 μg/mL) e 2x CIM (1 μg/mL), e com anfotericina B na CIM (0,5 μg/mL), após 72 horas de incubação. 33

Figura 8 - Curva de crescimento de espécies de *C. albicans* ATCC 90028 (A) e de *C. parapsilosis* ATCC 22019 (B) sem tratamento e tratadas com punicalagina com valores correspondentes a ½ CIM (2 μg/mL), CIM (4 μg/mL) e 2x CIM (8 μg/mL) e com fluconazol na CIM (1 μg/mL) após 24 horas de incubação. .. 34

Figura 9 - Perfil de esterois analisados por espectrofotometria UV (230-300nm). (A) de *C. gattii* ATCC 24065 sem tratamento (a); na presença de punicalagina em concentrações de ½ CIM de 2 μg/mL; (b) e em CIM de 4 μg/mL (c); (B) de *C. albicans* ATCC 90028 sem tratamento (a), na presença de punicalagina em concentrações de ½ CIM de 2 μg/mL (b) e em CIM de 4 μg/mL (c) 35

Figura 10 - Análise da morfologia celular de *C. neoformans* ATCC 28957. As células não tratadas com características ovóides e íntegras (A, C e E) e tratadas com

punicalagina na CIM (4 μg/mL), leveduras murchas com cápsula rugosa (B, D e F). 36

Figura 11 - Análise da morfologia celular de *C. gattii* ATCC 24065. As células não tratadas com características ovoides e íntegras (A, C e E) e tratadas com punicalagina na CIM (4 μg/mL), leveduras murchas com cápsula rugosa (B, D e F) 37

Figura 12 - Análise da morfologia celular de *C. albicans* ATCC 90028. As células sem tratamento ovoides, íntegras e com superfície lisa (A, C e E) e tratadas com punicalagina com uma CIM de 4 μg/mL, com redução do número de células e de blastoconídios (B, D e F)..... 38

Figura 13 - Análise da morfologia celular de *C. parapsilosis* ATCC 22019. As células sem tratamento ovoides, íntegras e com superfície lisa (A, C e E) e tratadas com punicalagina com uma CIM de 4 μg/mL, com redução do número de células e de blastoconídios (B, D e F)..... 39

Figura 14 - Microscopia eletrônica de transmissão das células de *C.neoformans* ATCC 28957; controle sem tratamento (A, C e E); tratamento com punicalagina (B, D e F) 40

Figura 15 - Microscopia eletrônica de transmissão das células de *C.gattii* ATCC 24065; controle sem tratamento (A, C e E); tratamento com punicalagina (B, D e F) 41

Figura 16 - Microscopia eletrônica de transmissão das células de *C. albicans* ATCC 90028; controle sem tratamento (A, C e E); tratamento com punicalagina (B, D e F) 42

Figura 17 - Microscopia eletrônica de transmissão das células de *C. parapsilosis* ATCC 22019; controle sem tratamento (A, C e E); tratamento com punicalagina (B, D e F) 43

Figura 18 - Histograma de análise da população celular de *C. gattii* ATCC 24065 e *C. albicans* ATCC 90028 por citometria de fluxo 44

Figura 19 - Análise do ciclo celular de *C. gattii* ATCC 24065 (A) e *C. albicans* ATCC 90028 (B) sem tratamento e tratados com punicalagina e anfotericina B durante 2 horas 44

Figura 20 - Histogramas mostrando fluorescência das células sem tratamento e das tratadas com punicalagina, indicando número de morte celular pela penetração de iodeto de propídio (IP) no meio intracelular de *C. gattii* ATCC 24065 de *C. albicans* ATCC 90028 45

Figura 21 - Permeabilidade da membrana celular pela penetração de iodeto de propídio (IP) em *C. gattii* ATCC 24065 (A) e *C. albicans* ATCC 90028 (B), após o tratamento com anfotericina B e punicalagina por 2 horas 45

Figura 22 - Efeito da punicalagina sobre a inibição da produção de espécies reativas de oxigênio em células de *C. gattii* ATCC 24065 (A) e *C. albicans* ATCC 90028 (B), após o tratamento com anfotericina B (2 µg/mL) e punicalagina (4 µg/mL e 16 µg/mL). As células foram incubadas durante 2, 6 e 24 horas a temperatura de 37 °C 46

Figura 23 - Perda do potencial de membrana mitocondrial, analisada pela adição de rodamina 123, nas células de *C. gattii* ATCC 24065 (A) e *C. albicans* ATCC 90028 (B) tratadas com anfotericina B (2 µg/mL) e punicalagina na CIM (4 µg/mL) e 4x CIM (16 µg/mL) 47

Figura 24 - Curva da viabilidade celular de fibroblastos da linhagem Balb-c 3T3 após exposição por um período de 48 horas em diferentes concentrações de punicalagina, pela incorporação do vermelho neutro (IC_{50}=58,7 µg/mL)..... 48

Figura 25 - Absorção do corante vermelho neutro por células 3T3 tratadas com diferentes concentrações de punicalagina e de anfotericina B..... 48

Figura 26 - Curva da viabilidade de células de carcinoma pulmonar humano A549 após exposição por um período de 45 horas de diferentes concentrações de punicalagina (IC_{50}= >200 µg/mL) 49

Figura 27 - Hemólise de eritrócitos de carneiro (porcentagem) na presença de punicalagina e anfotericina B em diferentes concentrações 50

Tabela 1 – Classificação atual de espécies de *Cryptococcus*..... 2

Tabela 2 - Concentração inibitória mínima (CIM) e fungicida (CFM) (µg/mL) da punicalagina sobre espécies do complexo *Cryptococcus neoformans* e espécies de *Candida*..... 32

Anexo A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Doenças Transmissíveis “Dr. Anuar Auad” 76

Anexo B - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas-UFG..... 77

Apêndice A - Antifungal potential of punicalagin against *Cryptococcus neoformans* species complex and *Candida* species 73

Apêndice B - Antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and modify the cellular cycle 87

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

24(28)-DHE	24(28)-Dihidroergosterol
Abs	Absorbância
ASD	Ágar *Sabouraud* Dextrose
ATCC	*American Type Culture Collection*
Balb/c	Camundongos albinos da raça Balb/c
CDC	*Centers for Disease Control and Prevention*
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	*Clinical and Laboratory Standards Institute*
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DCFH-DA	2',7'-diacetato de diclorofluoresceina
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ERG11	Gene codificador da enzima lanosterol 14-α-esterol desmetilase
ERG3	Gene codificador da enzima C-5 esterol desaturase
ERRO	Espécies Reativas de Oxigênio
F	Fator de Diluição
HAM'S-F12	*Ham's Nutrient Mixture F12 liquid*
HDT/HAA	Hospital de Doenças Tropicais de Goiás - Dr. Anuar Auad
HEPES	N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico)
HIV	*Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Adquirida)
IC_{50}	Índice de Citotoxicidade em 50% das células
IP	Iodeto de Propídio
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT	Brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
PBS	*Phosphate Buffer Saline* (Tampão Fosfato de salina)
RPMI	*Royal Park Memorial Institute*

$\Delta\Psi m$	Potencial de Membrana Mitocondrial
λ	Comprimento de Onda

RESUMO

Título: Atividade da punicalagina em leveduras do Complexo *Cryptococcus neoformans* e de espécies de *Candida*

Introdução: a elevada incidência e taxa de mortalidade por infecções fúngicas despertam o interesse pela busca por fármacos mais eficazes e menos tóxicos para o tratamento dessas infecções. Plantas medicinais representam uma promissora fonte de descoberta de agentes antifúngicos. Dentre as plantas medicinais, a *Lafoensia pacari* A. St.-Hil (Lythraceae), planta do cerrado, destaca-se por apresentar propriedades medicinais conhecidas popularmente no Brasil. A punicalagina, um metabólito secundário extraído da folha da *L. pacari*, apresenta comprovadas atividades biológicas. **Objetivo**: neste trabalho foi avaliada a atividade biológica de punicalagina sobre leveduras pertencentes ao complexo *Cryptococcus neoformans* e espécies de *Candida*. **Métodos**: a suscetibilidade *in vitro* das leveduras ao composto punicalagina, foi verificada usando-se o método de microdiluição em caldo. O possível mecanismo de ação foi verificado por diferentes métodos como: doseamento de ergosterol da membrana da célula fúngica, por análises morfológicas e ultraestruturais das leveduras, por citometria de fluxo (ciclo celular, lesão da membrana citoplasmática, produção de espécies reativas de oxigênio e perda do potencial da membrana mitocondrial). A citotoxicidade *in vitro* de punicalagina foi verificada utilizando-se células Balb/c 3T3, células de carcinoma pulmonar A549 e eritrócitos de carneiro. **Resultados**: a punicalagina foi capaz de inibir o crescimento das leveduras em concentrações $\leq$ 4 µg/mL com concentração fungicida mínima (CFM) de > 256 µg/mL. A punicalagina reduziu a síntese de ergosterol da membrana celular fúngica e promoveu alterações na morfologia e no arranjo celular das leveduras. O mecanismo de ação analisado por citometria de fluxo mostrou alteração do ciclo celular com aumento das fases G0/G1 e redução das fases G2/M, interferindo na divisão celular do DNA das células fúngicas. O composto mostrou baixa toxicidade sobre as células Balb/c 3T3, A549 e eritrócitos de carneiro. **Conclusão**: os resultados apresentados pela ação da punicalagina mostraram que este composto apresenta baixa citotoxicidade para as células animais, com importante atividade antifúngica para as leveduras do complexo *Cryptococcus neoformans* e *Candida*.

Palavras-chave: Punicalagina; Atividade Antifúngica; *Candida*; *Cryptococcus neoformans.*

ABSTRACT

Title: Activity of punicalagin against yeast *Cryptococcus neoformans* Complex and *Candida* species

Introduction: the high incidence and mortality rate due to fungal infections arouse interest in the search for more effective and less toxic drugs for the treatment of these infections. Medicinal plants represent a promising source of discovery of antifungal agents. Among the medicinal plants, *Lafoensia pacari* A. St.-Hil (Lythraceae), plant of the cerrado, stands out for having medicinal properties popularly known in Brazil. Punicalagin, a secondary metabolite extracted from *L. pacari* leaf, has proven biological activities. **Objective:** in this work the biological activity of punicalagin on yeasts belonging to the *Cryptococcus neoformans* species complex and *Candida* species was evaluated. **Methods:** the *in vitro* susceptibility of the yeast to the compound punicalagin was verified using the broth microdilution method. The possible mechanism of action was verified by different methods such as: ergosterol assay of the fungal cell membrane, by morphological and ultrastructural analyzes of the yeasts, by flow cytometry (cell cycle, cytoplasmic membrane injury, reactive oxygen species production and loss of the mitochondrial membrane potential). The *in vitro* cytotoxicity of punicalagin was verified using Balb/c 3T3 cells, A549 lung carcinoma cells and sheep erythrocytes. **Results:** the punicalagin was able to inhibit yeast growth at concentrations ≤4 μg/mL with minimum fungicidal concentration (CFM) of >256 μg/mL. The punicalagin reduced the ergosterol synthesis of the fungal cell membrane and promoted alterations in the morphology and the cellular arrangement of the yeasts. The action mechanism analyzed by flow cytometry showed alteration of the cell cycle with increase of the G0/G1 phases and reduction of the G2/M phases, interfering in the cellular division of the DNA of the fungal cells. The compound showed low toxicity on the Balb/c cells 3T3, A549 and sheep erythrocytes. **Conclusion:** the results presented by punicalagin showed that this compound presents low cytotoxicity to the animal cells, with important antifungal activity against the yeasts of the *Cryptococcus neoformans* species complex and *Candida* species.

Key words: Punicalagin; Antifungal Activity; *Candida*; *Cryptococcus neoformans*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1
1.1 CRIPTOCOCOSE 1
1.2 CANDIDÍASE 4
1.3 ANTIFÚNGICOS 6
1.4 PUNICALAGINA 10
2 JUSTIFICATIVA 14
3 OBJETIVOS 16
3.1 OBJETIVO GERAL 16
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 16
4 MÉTODOS 17
4.1 OBTENÇÃO DE PUNICALAGINA 17
4.2 ISOLADOS 17
4.3 TESTE DE SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* 17
4.3.1 Preparo do inóculo 18
4.3.2 Procedimento do teste de microdiluição em caldo 18
4.3.3 Interpretação dos resultados 19
4.4 ENSAIOS DE CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM) 19
4.5 CINÉTICA DE CRESCIMENTO/ CURVA DE MORTE 19
4.6 DOSEAMENTO DE ERGOSTEROL 21
4.7 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS 22
4.7.1 Microscopia eletrônica de varredura 22
4.7.2 Microscopia eletrônica de transmissão 23
4.8 ENSAIOS UTILIZANDO CITOMETRIA DE FLUXO 23
4.8.1 Avaliação do ciclo celular 24
4.8.2 Avaliação da permeabilidade da membrana 25
4.8.3 Avaliação de estresse oxidativo pelo aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) intracelulares 25
4.8.4 Avaliação da perda de potencial da membrana ($\Delta\Psi m$) 26
4.9 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DE PUNICALAGINA 26
4.9.1 Obtenção, cultivo e viabilidade das células de Linhagens 3T3 e A549 26

4.9.1.1 Avaliação do potencial de citotoxicidade em células 3T3 27
4.9.1.2 Avaliação do potencial de citotoxicidade em células A549 29
4.9.2 Ensaio hemolítico 30
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA 31
5 RESULTADOS 32
5.1 TESTE DE SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* 32
5.2 CINÉTICA DE CRESCIMENTO/CURVA DE MORTE 33
5.3 DOSEAMENTO DE ERGOSTEROL 34
5.4 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS 35
5.4.1 Microscopia eletrônica de varredura 35
5.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão 39
5.5 ANÁLISE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO 43
5.5.1 Avaliação do ciclo celular 43
5.5.2 Avaliação da permeabilidade da membrana celular 44
5.5.3 Avaliação do estresse oxidativo pela geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) 46
5.5.4 Avaliação da perda de potencial da membrana ($\Delta\Psi m$) 46
5.6 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* 47
5.6.1 Potencial de citotoxicidade em células Balb/c 3T3 47
5.6.2 Avaliação do potencial de citotoxicidade em células A549 49
5.6.3 Ensaio hemolítico 49
6 DISCUSSÃO 51
7 CONCLUSÕES 54
REFERÊNCIAS 55
ANEXOS 76
APÊNDICE 78

1 INTRODUÇÃO

Os fungos, de grande ocorrência na natureza, são cada vez mais reconhecidos como importantes patógenos, causando desde infecções superficiais até sistêmicas (MARR et al., 2002; TYAGI, 2016). Vários fatores contribuem para o aumento de infecções fúngicas, como a utilização de agentes antineoplásicos e imunossupressores, antibióticos de largo espectro, próteses, enxertos e cirurgias. Outras condições, como queimaduras, neutropenia, infecção por HIV (Human Immunodeficiency Virus) também predispõem os pacientes ao aparecimento de infecções fúngicas (EGGIMANN; GARBINO; PITTET, 2003; NOVAK; PLEŠKO, 2016). Entre os principais fungos responsáveis por essas infecções, estão os gêneros *Cryptococcus* e *Candida*, leveduras comumente isoladas na prática clínica (ENOCH; LUDLAM; BROWN, 2006).

Embora existam diferentes antifúngicos disponíveis no mercado, há uma necessidade urgente de desenvolver novos agentes antifúngicos com amplo espectro de ação, com alvos seletivos para o patógeno de tal modo que tenha reduzida toxicidade para o hospedeiro e simultaneamente tenha uma grande eficácia (XIE et al., 2014; COELHO; CASADEVALL, 2016; SANGLARD, 2016). As terapias utilizadas para as leveduras são muitas vezes tóxicas e pouco eficazes. Assim, a busca por antifúngicos para tratar criptococose e candidíase merece destaque, sendo alvo de diferentes pesquisas.

1.1 CRIPTOCOCOSE

A criptococose é uma micose sistêmica grave, causada por leveduras encapsuladas do gênero *Cryptococcus* (MAZIARZ; PERFECT, 2016). Leveduras do complexo *Cryptococcus neoformans* (*Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*) são classificadas taxonomicamente como pertencentes ao subfilo Basidiomycota (CASADEVALL; PERFECT, 1998; SRIKANTA; SANTIAGO-TIRADO; DOERING, 2014) e são capazes de causar uma infecção oportunística denominada criptococococose que atinge homem e animais (KROCKENBERGER; CANFIELD; MALIK, 2003; HAGEN et al., 2012).

As leveduras do complexo *C. neoformans* estão divididas em duas espécies distintas: *C. neoformans e C. gattii* com diferentes sorotipos que variam de acordo com as características antigênicas da cápsula. A espécie *C. neoformans*, compreende os

sorotipos A (var. *grubii*), D (var. *neoformans*) e o híbrido AD que apresentam características de ambos os sorotipos A e D, enquanto a espécie *C. gatti* abrange os sorotipos B e C. Hagen et al. (2015) propuseram diferentes tipos moleculares inseridos em cada espécie e sorotipos, os quais estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Classificação atual de espécies de *Cryptococcus*

Sorotipos	**Espécies e variedades**	**Tipos moleculares**
A	*C. neoformans* var. *grubii*	VN I, VN II
B	*C. gattii*	VG I, VG II, VG III, VG IV
C	*C. gattii*	VG I, VG II, VG III, VG IV
D	*C. neoformans* var. *neoformans*	VN IV
AD	*C. neoformans*	VN III

Fonte: adaptada de Hagen et al. (2015).

A espécie *C. neoformans* apresenta distribuição cosmopolita, e frequentemente é encontrada em excretas dessecadas de aves, especialmente de pombos (EMMONS, 1955; LI; MODY, 2010). Essa espécie causa infecção principalmente em imunocomprometidos (RODRIGUES; ALVIANO; TRAVASSOS, 1999; LACAZ et al., 2002).

C. gattii é encontrado em áreas de plantações de eucaliptos em climas tropicais e subtropicais (KWON-CHUNG; BENNETT, 1984; ELLIS; PFEIFFER, 1990; CHEN; MEYER; SORRELL, 2014). Essa espécie causa infecções normalmente em indivíduos imunocompetentes, sendo considerada como um patógeno primário (KWON-CHUNG; VARMA, 2006; BIELSKA; MAY, 2016).

A criptococose ocorre por meio da inalação de basidiósporo e(ou) leveduras desidratadas carreadas pelo ar a partir de fontes ambientais como solo, árvores e fezes de pombos (SPRINGER; CHATURVEDI, 2010). As células fúngicas inaladas se alojam no trato respiratório superior, principalmente nos alvéolos (Figura 1) (PHILLIPS et al., 2015). A partir dos alvéolos pode ocorrer a eliminação dos conídios ou a evolução para infecção latente com a formação de granuloma, e dependendo do status imunológico do hospedeiro, se disseminar por via hematogênica ou linfática, produzindo infecção (IDNURM et al., 2005).

Os fungos do complexo *C. neoformans* têm predileção para o estabelecimento da doença nos pulmões e no sistema nervoso central (SNC). Se o patógeno atingir o SNC

pode causar a forma mais grave de criptococose, a meningoencefalite, que se não tratada adequadamente pode ser fatal (MITCHELL et al., 1995; BIELSKA; MAY, 2016).

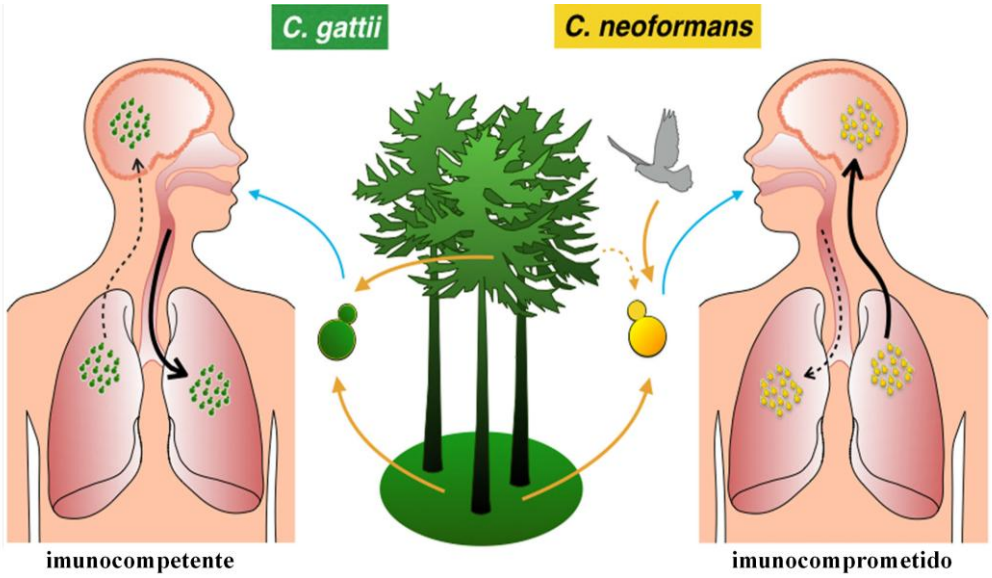

Figura 1 -Processo de infecção de *C. gattii* (esquerda) e *C. neoformans* (direita). A infecção começa após inalação dos propágulos, que chegam aos pulmões. *C. neoformans* e *C. gattii* se diferenciam pelas condições imunológicas, órgão de preferência do hospedeiro e origem dos propágulos.
Fonte: adaptada de Bielska May (2016).

Outras regiões do hospedeiro podem ser acometidas com menor frequência como pele, linfonodos, rins, próstata, olhos e ossos/articulações (MAZIARZ; PERFECT, 2016). Entretanto, deve-se ressaltar que em pessoas imunocomprometidas essas leveduras podem se disseminar e infectar vários órgãos, e se instalar em qualquer parte do corpo humano (SANTANGELO et al., 2004).

Além de causar alterações imunológicas no hospedeiro a infecção pode também estar ligada a fatores relacionados ao microrganismo. O fungo apresenta características biológicas ou fatores de virulência que demonstram a sua capacidade de desencadear infeção (RODRIGUES; ALVIANO; TRAVASSOS, 1999). Entre os fatores de virulência, destacam-se a cápsula mucilaginosa composta por polissacarídeos, a produção de melanina e a capacidade de se desenvolver em temperaturas fisiológicas, em torno de 37 °C (HULL; HEITMAN, 2002; PERFECT, 2005).

A cápsula é um importante fator de virulência que interfere na resposta imunológica do hospedeiro. Este componente do fungo cobre os antígenos da levedura e impede a sua apresentação aos macrófagos o que evita a fagocitose e a sua destruição

por polimorfonucleares e macrófagos, dificultando a ação do sistema imune (GRECHI et al., 2011).

A produção de melanina que se deposita na parede do fungo é procedente de substratos contendo dopamina e da ação de enzimas catalizadoras como a fenoloxidase produzida por esses microrganismos (WILLIAMSON, 1997). Essa enzima atua sobre esses substratos, gerando a melanina pela oxidação de compostos fenólicos (CASADEVALL; ROSAS; NOSANCHUK, 2000). Esse pigmento, quando expresso, pode ter um papel biológico de proteger as leveduras contra estresse oxidativo do hospedeiro e explicar o neurotropismo fúngico para locais com altas concentrações de catecolaminas (WILLIAMSON, 1997; CASADEVALL, 2010). O fato do cérebro ser rico em catecolaminas tais como a dopamina, justifica essa predisposição desses organismos em infectarem o SNC (RODRIGUES; ALVIANO; TRAVASSOS, 1999).

O crescimento do fungo a 37 °C é fundamental para que as espécies de *C. gattii* e *C. neoformans* sejam capazes de produzir infecções em humanos. Essa capacidade é regulada pela presença do gene calcineurina que permite que o microrganismo se adapte a esta temperatura (LIU et al., 1991). Isolados que não possuem esse gene são considerados avirulentos, ou seja, a cepa está viável, mas perdem a capacidade de produzir infecção (ODOM et al., 1997; CHEN et al., 2013).

1.2 CANDIDÍASE

As infecções causadas por leveduras do gênero *Candida* são essencialmente oportunísticas e denominadas de candidíase (LIM et al., 2012).

Espécies do gênero *Candida* são frequentemente comensais, mas, em determinadas situações, podem causar infecção em diversos locais do hospedeiro variando desde uma infecção superficial até sistêmica (LARRIBA et al., 2000; CALDERONE, 2002).

Dentre as várias espécies isoladas, *Candida albicans* (*C. albicans*) continua sendo a espécie mais prevalente, entretanto, espécies não-*albicans*, particularmente *Candida tropicalis, Candida glabrata* e *Candida parapsilosis*, têm adquirido crescente importância (KAO et al., 1993; KIM; JEON; KIM, 2016).

A maioria das infecções por *Candida* ocorre a partir de fontes endógenas, causada pelos próprios microrganismos residentes da microbiota (TAYLOR et al., 2003; PFALLER; DIEKEMAA, 2010). Fontes exógenas de infecção ocorrem

especialmente nos serviços de saúde onde a transmissão é proveniente dos profissionais da saúde, ou entre pacientes, e até mesmo por instrumentos contaminados (ASMUNDSDÓTTIR et al., 2008; PFALLER; DIEKEMAA, 2010).

Na passagem de colonizadores a infectantes, ou na aquisição de fungos por via exógena, ocorrem mudanças significativas no fungo, incluindo a ativação de genes de virulência, que permite a rápida detecção de adversidades e ajustes em diferentes locais do corpo, tais como mudanças de temperatura, do potencial hidrogeniônico (pH), da osmolaridade, da disponibilidade de oxigênio e de nutrientes (POLVI et al., 2015). Uma associação entre os fatores relacionados ao hospedeiro como estado imunológico, alteração de pele e(ou) de mucosas, além de mudanças na microbiota, com os fatores de virulência expressos por espécies de *Candida*, facilita a invasão ao hospedeiro e consequentemente, instalação da doença (BERMAN; SUDBERY, 2002; KUMAMOTO; VINCES, 2005).

Entre os principais fatores de virulência relacionados com a patogenicidade das espécies do gênero *Candida*, destacam-se fatores de adesão às células do hospedeiro, secreção de enzimas de degradação (hidrolíticas), como proteases, fosfolipases e lipases, e o efeito *switching* (variabilidade fenotípica) (LIM et al., 2012).

Os fungos do gênero *Candida* são considerados os principais microrganismos responsáveis por infecções fúngicas invasivas e da corrente sanguínea (BITAR et al., 2014). Nos Estados Unidos, a candidemia corresponde a cerca de 8% dessas infecções, representando a quarta causa de infecções sanguíneas nosocomiais. Na Europa, candidíase invasiva é frequentemente relatada e aparece em sétima posição entre as causas habituais de infecções sanguíneas (GUDLAUGSSON et al., 2003; MARCHETTI et al., 2004; WISPLINGHOFF et al., 2004; MORGAN et al., 2005) e, no Brasil, de acordo com Doi et al. (2016), a candidemia representa a sétima posição entre as infecções da corrente sanguínea.

A candidíase invasiva tem uma elevada taxa de mortalidade, entre 45% e 75%, apesar da disponibilidade de vários agentes antifúngicos (BROWN et al., 2012). A alta morbidade e mortalidade associadas à candidíase ocorrem principalmente devido à falta de ferramentas de diagnóstico precoce e preciso e ao surgimento de resistência aos medicamentos (XIAO et al., 2016).

1.3 ANTIFÚNGICOS

Existem três classes de antifúngicos sistêmicos que são largamente utilizadas para o tratamento de infecções fúngicas: os poliênicos, os azólicos e as equinocandinas (DELATTIN; CAMMUE; THEVISSEN, 2014).

A membrana e a parede das células fúngicas são os mais importantes alvos para atuação dos antifúngicos sistêmicos. Essas barreiras físicas e químicas são responsáveis pela comunicação com o meio ambiente e, por conseguinte, tem um papel chave no processo de metabolismo (HECTOR, 1993; SHAPIRO; ROBBINS; COWEN, 2011). O ergosterol é o principal componente da membrana da célula fúngica, funciona como um biorregulador da fluidez e é responsável pela assimetria e integridade dessa membrana (KATHIRAVAN et al., 2012). O β-1,3-D-glucana, componente importante da parede celular fúngica, pode ser rompido pela ação de determinados antifúngicos (SHAPIRO; ROBBINS; COWEN, 2011).

As células fúngicas apresentam características semelhantes aos dos animais, como por exemplo, a presença de núcleo e membrana nuclear que as definem como células eucarióticas e, além disso, há também similaridade nos processos bioquímicos das duas células. Isto resulta em dificuldades na identificação de alvos antifúngicos distintos que forneçam seletividade fúngica, sem causarem toxicidade para o hospedeiro (BUTTS et al., 2016).

Os derivados poliênicos incluem anfotericina B e a nistatina, e têm como principal mecanismo de ação a alteração na permeabilidade da membrana plasmática da célula fúngica. Possuem como mecanismo de ação clássico a formação de poros na membrana celular fúngica a partir da interação específica com ergosterol, esteróide constituinte dessa membrana. A alteração da permeabilidade celular permite, portanto, o escape de pequenos íons e metabólitos, principalmente potássio, levando à morte celular (GOTTLIEB et al., 1958; FINKELSTEIN; HOLZ, 1973; BRAJTBURG et al., 1990).

Os poliênicos apresentam um amplo espectro de ação contra espécies do complexo *C. neoformans*, espécies de *Candida* e *Aspergillus* sp. Além disso, possuem atividade contra os fungos dimórficos, incluindo espécies de *Histoplasma capsulatum*, de *Blastomyces dermatitidis*, de *Coccidioides immitis* e *Coccidioides posadasii* e de *Paracoccidioides* sp. (LI et al., 2000; SABATELLI et al., 2000; MCGINNIS et al., 2001). Anfotericina B constitui a primeira escolha para o tratamento de doenças como a criptococose e zigomicose (WANESS; DAWSARI; AL JAHDALI, 2009; PERFECT et

al., 2010) e como terapia alternativa para a aspergilose, candidíase invasiva e outras infecções fúngicas sistêmicas (GÓMEZ-LÓPEZ et al., 2008; CORNELY et al., 2012; ARENDRUP et al., 2013).

Outros mecanismos de ação também foram descritos para anfotericina B, tais como dano celular oxidativo, causado por indução da formação de espécies reativas de oxigênio, por exemplo, superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, capazes de oxidar a membrana lipídica (LAMY-FREUND; FERREIRA; SCHREIER, 1985). O dano de oxidação induzido pela anfotericina B pode afetar outras funções celulares não relacionadas com alterações na permeabilidade celular (SOKOL-ANDERSON; BRAJTBURG; MEDOFF, 1986; SOKOL-ANDERSON et al., 1988). O fármaco pode ligar-se a receptores de lipoproteínas de baixa densidade e provavelmente modificar a sua estrutura por oxidação (BARWICZ et al., 1998; BARWICZ; GRUDA; TANCREDE, 2000). Pode ainda mediar a morte das células fúngicas por indução de um *burst* oxidativo intracelular forte que pode ser responsável pela carbonização de proteínas (SANGALLI-LEITE et al., 2011). Outro mecanismo de ação baseia-se na adsorção superficial em que as moléculas de anfotericina B se posicionam paralelamente à camada lipídica, desestabilizando-a e sequestrando o ergosterol para a superfície da bicamada (DE KRUIJFF; DEMEL, 1974; MOURI et al., 2008).

A anfotericina B é um dos mais potentes antifúngicos, usada há mais de 50 anos pela população é considerada padrão-ouro para o tratamento de algumas doenças fúngicas sistêmicas. Consideráveis problemas de toxicidade e biodisponibilidade oral têm sido descritos para anfotericina B (DONOVICK et al., 1955). Desvantagens associadas à anfotericina B foram relatadas como via de administração do medicamento, redução de potássio no sangue e disfunção renal (ANDRIOLE, 2000; BATES et al., 2001), sendo o último efeito a maior causa de limitação do seu uso. A toxicidade de anfotericina B para o hospedeiro, ocorre provavelmente devido às semelhanças estruturais entre o ergosterol da membrana fúngica e o colesterol da membrana da célula do hospedeiro (FANOS; CATALDI, 2000; OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2010). Formulações lipossomais desenvolvidas nas últimas décadas amenizaram significativamente esses problemas, mas o alto custo destas formulações inviabiliza o seu uso (HAMILL, 2013).

Relatos de resistência a anfotericina B não são muito comuns. Algumas espécies como *Candida lusitaniae* (DIEKEMA et al., 2003; PFALLER et al., 2003, 2005), *Aspergillus terreus*, *Scedosporium* sp., *Fusarium* sp. (SABATELLI et al., 2000;

MELETIADIS et al., 2002; DIEKEMA et al., 2003; ALMYROUDIS et al., 2007), apresentam baixa sensibilidade, ou até mesmo resistência a anfotericina B. A resistência está associada a mutações no gene ERG3 que codifica a C-5 esterol desaturase, enzima responsável pela a biossíntese do ergosterol, substituindo o ergosterol por outros esterois, reduzindo a afinidade molecular de anfotericina B (KELLY et al., 1997; MORIO et al., 2012).

A classe de antifúngicos azólicos é composta por imidazólicos (clotrimazol, cetoconazol, miconazol, econazol, tioconazol) e triazólicos (fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazole), que são classificados de acordo com o número de átomos de hidrogênio no anel azólico, sendo que os imidazólicos possuem dois átomos de hidrogênio, enquanto os triazólicos possuem três átomos (SAAG; DISMUKES, 1988). Dentre os derivados azólicos, fluconazol, voriconazol e itraconazol são os mais utilizados para infecções sistêmicas, e mais recentemente tem sido descrito o uso de posaconazol, que se diferencia dos outros azólicos por possuir atividade *in vitro* contra *Mucor* sp., microrganismo resistente aos outros azólicos (SHAPIRO; ROBBINS; COWEN, 2011; LUO et al., 2013) e o isavuconazol, que apresenta amplo espectro de ação e disponibilidade por via oral e intravenosa (GONZÁLEZ, 2009).

Os azólicos são a classe mais utilizada de fármacos antifúngicos com amplo espectro de ação (LASS-FLÖRL, 2011), incluindo as micoses causadas por diversas espécies de *Candida*, *Cryptococcus*, dermatófitos e por infecções endêmicas como blastomicose norte americana, coccidioidomicose e histoplasmose (SHEPPARD; LAMPIRIS, 2008). O fluconazol não apresenta atividade clinicamente relevante contra fungos filamentosos, enquanto, o itraconazol, o voriconazol e o posaconazol têm atividade contra leveduras e fungos filamentosos (LASS-FLÖRL, 2011).

Os derivados azólicos atuam inibindo a ação da enzima lanosterol-14-α-demetilase no complexo citocromo P-450 dos fungos. O resultado é a inibição da conversão de lanosterol em ergosterol, com a depleção conseguinte de ergosterol, acumulo de precursores e perda da integridade da membrana fúngica (HEIMARK et al., 1990; HITCHCOCK et al., 1990; MUNAYYER et al., 2004). Os azólicos são geralmente fungistáticos contra leveduras e fungicidas contra fungos filamentosos (COWEN; STEINBACH, 2008).

Relatos de *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* resistentes aos azólicos têm sido documentados (ARENDRUP; PERLIN, 2014; CASTANHEIRA et

al., 2014; PFALLER et al., 2014; SOUZA et al., 2015). São conhecidos três principais mecanismos de resistência aos azólicos. O primeiro mecanismo associado à resistência de azólicos é a indução de bombas de efluxo multidroga que resultam em concentrações reduzidas do fármaco no alvo da enzima lanosterol-14-α-esterol-desmetilase na célula fúngica (ALBERTSON et al., 1996; SANGLARD et al., 1997). O segundo mecanismo de resistência envolve a alteração ou a autorregulação da enzima alvo lanosterol-14-α-esterol-desmetilase, que é codificada pelo gene ERG11, impedindo assim a ligação de azólicos a enzima alvo (LÖFFLER et al., 1997). O terceiro mecanismo está relacionado ao desenvolvimento de mutação do gene ERG3, que resulta na redução do teor de ergosterol na membrana da célula fúngica e leva à acumulação do produto tóxico 14-α-metil-3,6-diol (KELLY et al., 1997).

A mais nova classe de antifúngicos é representada pelas equinocandinas, constituídas de anidulafungina, micafungina e caspofungina, que atuam na parede da célula fúngica, inibindo a síntese de β-1,3-D-glucana, polissacarídeo estrutural da parede celular, prejudicando a sua integridade (DENNING, 2003). Essa inibição faz com que a parede celular se rompa, resultando em instabilidade e morte celular (ONISHI et al., 2000).

As equinocandinas têm atividade fungicida contra espécies de *Candida* e fungistática contra espécies de *Aspergillu*s (SHAPIRO; ROBBINS; COWEN, 2011). Relatos de resistência à equinocandinas são raros (WIEDERHOLD et al., 2008), e ocorrem nas leveduras devido à modificação do alvo da célula fúngica através de mutações pontuais do gene. Mecanismo semelhante de resistência em fungos filamentosos foi documentado por Pemán; Cantón; Espinel-Ingroff (2009).

Resistência a fungos patogênicos pode levar a falhas terapêuticas e resultados clínicos insatisfatórios em pacientes que sofrem de infecções fúngicas que ameaçam a vida (XIE, POLVI *et al.*, 2014). Recentemente, o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) considerou leveduras do gênero *Candida* resistentes aos azólicos como uma séria ameaça para a saúde humana, comparada ao mesmo nível de ameaça de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. Segundo o CDC (2013), fungos do gênero *Candida*, são responsáveis por, aproximadamente, 46 mil infecções por ano entre pacientes hospitalizados.

Diante do exposto, a busca por novos agentes antifúngicos mais ativos, com menores efeitos colaterais, baixa toxicidade e custo tem sido de grande importância no

tratamento das infecções fúngicas. Neste contexto, os produtos naturais podem servir como alternativas de tratamento para as infecções fúngicas.

1.4 PUNICALAGINA

As plantas medicinais fazem parte da evolução humana como os primeiros recursos terapêuticos utilizados pela população (DI STASI, 1996; MACIEL et al., 2002). Ao longo dos séculos, produtos extraídos das folhas, troncos, raízes, frutos e tubérculos têm sido utilizados pelo homem para as necessidades básicas como alimentação, roupas e abrigo, e para outros fins como produção de venenos, de alucinógenos e de medicamentos (HARBORNE, 1984).

Os compostos extraídos das amostras vegetais podem ser divididos em dois grandes grupos: os metabólitos primários, envolvidos diretamente no crescimento e no metabolismo das plantas, tais como os carboidratos, aminoácidos e lipídeos; e os secundários que são compostos elaborados a partir dos metabólitos primários e, que estão envolvidos principalmente em atividades de defesa tais como contra herbívoros e microrganismos, e a proteção contra os raios ultravioleta (SANTOS; MELO, 2007; IRCHHAIYA et al., 2015).

Com base nas suas origens biossintéticas, os metabólitos secundários podem ser divididos em três grupos principais: terpenoides, alcaloides e fenólicos, este último representa o objeto deste estudo (MAHMOUD; CROTEAU, 2002).

São conhecidas cerca de oito mil estruturas diferentes de compostos fenólicos (FRANCISCO, 1995), às quais se caracterizam por apresentarem, pelo menos, um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilas ligadas (IRCHHAIYA et al., 2015). A estrutura molecular desses compostos contribui para o amplo espectro de atividades biológicas apresentadas, sendo frequentemente reconhecidas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; DEL RIO et al., 2013; DZIALO et al., 2016).

Os compostos fenólicos podem ser classificados em dois grupos: os flavonoides e os não flavonoides (IRCHHAIYA et al., 2015). Os flavonoides são os mais numerosos compostos fenólicos e são encontrados em todo o reino vegetal. As principais subclasses de flavonoides são as flavonas, flavonóis, flavan-3-ols, isoflavonas, flavanonas e antocianidinas (FRANCISCO, 1995).

Na classe de compostos fenólicos, não flavonoides, estão os ácidos fenólicos, mais notavelmente ácido gálico, os hidroxicinamatos e seus derivados conjugados, e os polifenólicos estilbenos, além dos taninos, lignanas e ligninas (OKUDA, 2005; IRCHHAIYA et al., 2015; LE FLOCH; JOURDES; TEISSEDRE, 2015). A classificação dos compostos fenólicos é apresentada na Figura 2.

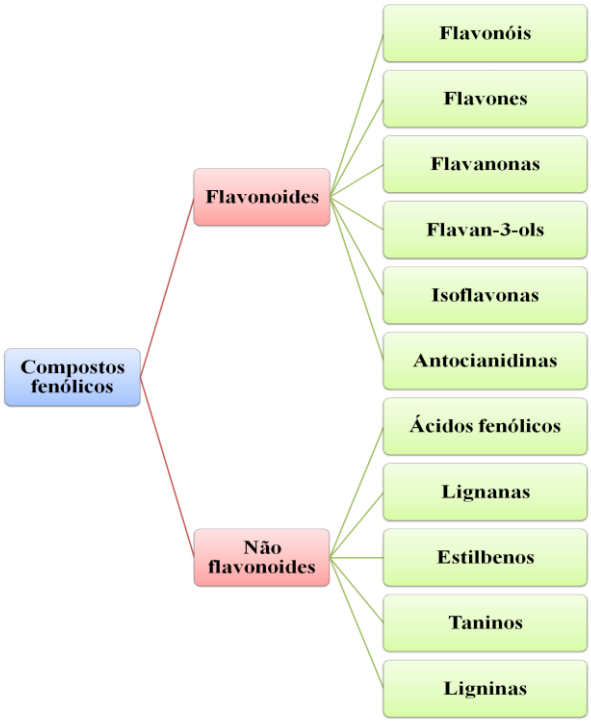

Figura 2 - Classificação dos compostos fenólicos

Fonte: adaptada de Dzialo et al. (2016).

Dentre os compostos fenólicos, os taninos têm sido alvos de diversos estudos por apresentarem promissoras atividades biológicas. Os taninos apresentam propriedades biológicas com importante ação antimicrobiana, anticarcinogênica e antioxidante (AL-MAMUN et al., 2016; TALEB et al., 2016; XU et al., 2016). Estes compostos possuem alta massa molecular, variando de 500 a 3000 Dalton, sendo solúveis em água, mas podem formar complexos insolúveis com alcaloides, gelatinas e proteínas (SANTOS; MELO, 2007). Os taninos distinguem-se quimicamente em dois grupos: os condensados e os hidrolisáveis (SANTOS; MELO, 2007). Os taninos condensados são abundantes no reino vegetal e são designados como proantocianidinas, responsáveis pelas características normalmente atribuídas a estas substâncias, como adstringência e precipitação de proteínas (HASLAM, 1989; OKUDA; YOSHIDA; HATANO, 1993; SANTOS; MELO, 2007). Os taninos hidrolisáveis são encontrados em plantas

dicotiledôneas, e constituídos por duas classes, os galotaninos que após hidrólise produzem ácido gálico, e os elagitaninos, que após hidrólise produzem ácido elágico (OKUDA; YOSHIDA; HATANO, 1993; NASCIMENTO; MORAIS, 1996).

Entre os elagitaninos, a punicalagina estudada neste trabalho foi identificada primeiramente em plantas como a *Punica granatum* L. Lythraceae e em espécies de *Terminalia* (*Combrethaceae*) (TANAKA; NONAKA; NISHIOKA, 1986; YOSHIDA; AMAKURA; YOSHIMURA, 2010) e, recentemente, a punicalagina foi extraída de folhas de *Lafoensia pacari* A. St.-Hil (Lythraceae) (CARNEIRO et al., 2016). A estrutura química desse composto é evidenciada na Figura 3.

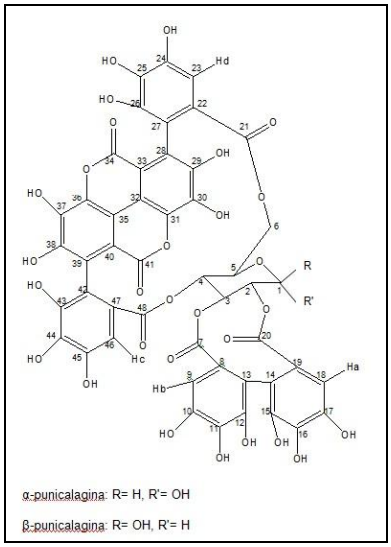

Figura 3 - Estrutura química da punicalagina
Fonte: Carneiro et. al. (2016).

L. pacari é uma árvore da família Lythraceae, natural de cerrado, mata ciliar e floresta de altitude. Essa espécie é conhecida popularmente como pacari, dedaleiro, dedal e mangava-brava (LORENZI, 2016). Esta planta ocorre em todos os estados brasileiros, estando presente desde o Amapá até ao Rio Grande do Sul. No estado de Goiás, Brasil, *L. pacari* é usada desde 1818 pela população indígena, e o seu nome, pacari, é uma palavra tupi-guarani (língua indígena) que significa "Madeira preciosa"(PROENÇA; OLIVEIRA; SILVA, 2000). Esta planta tem sido encontrada em outros países da América do Sul como Paraguai e Bolívia (CARVALHO, 1994; PROENÇA; OLIVEIRA; SILVA, 2000).

Experimentos detectaram em *L. pacari*, atividades antimicrobianas (LIMA et al., 2006), antivirais (MÜLLER et al., 2007), anti-inflamatórias, analgésicas,

antiedematosas (ROGERIO et al., 2006; GUIMARÃES et al., 2010), antioxidantes, antineoplásicas (SOLON et al., 2000), e antidepressivas (GALDINO et al., 2009), demonstrando-se o potencial farmacológico variado dessa planta.

Dentre as atividades relatadas para punicalagina são demonstrados efeitos hepatoprotetores (SHAH et al., 2016), antidiabéticos (BANIHANI; SWEDAN; ALGURAAN, 2013), apoptóticos (WANG et al., 2013), antioxidantes (SHAO et al., 2016), antineoplásicos (HEBER, 2008), antimaláricos (DELL'AGLI et al., 2010), antimicrobianos com ação sobre *Listeria monocytogenes*, *Helicobacter pylori* e enterotoxinas estafilocócicas (GUANGHUI et al., 2014; SILVA et al., 2015b; SHIMAMURA et al., 2016), e antivirais contra vírus que utilizam glicosaminoglicanos para entrada na célula e inibição de moléculas da replicação de HCV (LIN et al., 2013; REDDY et al., 2014). Com relação à atividade antifúngica apresentada por punicalagina, merece destaque a suscetibilidade de dermatófitos (FOSS et al., 2014) e de espécies de *Candida* a esse composto (LIU et al., 2009; ENDO et al., 2010; ANIBAL et al., 2013).

Diante das considerações descritas acima, nos propusemos a avaliar algumas características da punicalagina, principalmente relacionados ao seu mecanismo de ação e à toxicidade desse produto.

2 JUSTIFICATIVA

Nas últimas duas décadas foi observado um aumento na incidência das infecções fúngicas invasivas (BROWN et al., 2012; LAGROU et al., 2015; ENOCH et al., 2017). Contribuíram para o aumento quantitativo das infecções fúngicas os crescentes casos de doenças que comprometem o sistema imunológico, como a síndrome da imunodeficiência humana (LAI et al., 2008; BROWN et al., 2012).

Os fungos do complexo *C. neoformans* e *Candida* sp. aparecem entre os principais patógenos capazes de causar infecções (PFALLER; DIEKEMAA, 2010). De acordo com PARK et al., (2009) estima-se uma prevalência de um milhão de casos e cerca de 650 mil mortes anuais por criptococose no mundo. Da mesma forma, a candidíase aparece no Brasil como uma das infecções mais prevalentes da corrente sanguínea (DOI et al., 2016) e apresenta cerca de 50% de mortalidade entre as casuíticas de infecção invasiva determinadas por fungos do gênero *Candida* (COLOMBO et al., 2014; LORTHOLARY et al., 2014).

O tratamento para essas infecções fúngicas pode não ser efetivo, tóxico, de alto custo e, em muitos casos, observa-se resistência dos microrganismos aos antifúngicos disponíveis no mercado. Assim, todos esses fatores estimulam a busca por novos compostos (GHANNOUM; RICE, 1999; PERFECT, 2013; SPITZER; ROBBINS; WRIGHT, 2016).

Nesse sentido, as pesquisas com plantas medicinais representam uma promissora fonte de descoberta de novos agentes antifúngicos (KINGSTON, 2011). Estudos realizados por nosso grupo com diferentes plantas medicinais revelaram boa atividade para diferentes fungos. *Hyptis ovalifolia* e *Eugenia uniflora* mostraram atividade para um grupo de fungos filamentosos, os dermatófitos (SOUZA et al., 2002); *Ocimum gratissimum* para espécies do complexo *Cryptococcus neoformans* (LEMOS et al., 2005); *Hymenaea martiana* para dermatófitos (DE SOUZA et al., 2009); *Pimenta pseudocaryophyllus* para espécies de *Candida* (ASSAL et al., 2014); *Hymenaea courbaril* para espécies de *Candida* e fungos pertencentes ao grupo de dermatófitos (DA COSTA et al., 2014).

Atividades biológicas de extratos ou compostos isolados de plantas do cerrado foram descritas por vários pesquisadores, destacando-se *L. pacari* (REICHLING et al., 2009; RIBEIRO et al., 2014; MARTINS et al., 2015; SILVA et al., 2015a; FARAH et al., 2016). No Brasil, *L. pacari* possui uso tradicional por suas propriedades medicinais,

e ensaios farmacológicos empregando produtos extraídos da folha dessa planta apresentaram comprovadas atividades atimicrobianas (SILVA JUNIOR et al., 2010; SILVA et al., 2012b; LIMA et al., 2013).

A punicalagina, composto fenólico extraído da folha de *L. pacari*, mostra propriedades antimicrobianas como antivirais (LIN et al., 2013; REDDY et al., 2014), antibacterianas (AGURI; ANAKA; OUNO, 2004; SILVA et al., 2012a) e antifúngicas. Punicalagina, entretanto, carece de estudos e o seu possível mecanismo de ação e citotoxicidade são muito importantes para que possa ser confirmado como potencial antifúngico.

Alguns mecanismos de ação já foram descritos para punicalagina, como análise dos efeitos na morfologia e ultraestrutura, formação de tubo germinativo e aderência de espécies de *Candida* (ENDO et al., 2010; ANIBAL et al., 2013), inibição da germinação conidial e microscopia de fluorescência de dermatófitos (FOSS et al., 2014). Maior ênfase a mecanismo de ação usando novas metodologias foi usada neste trabalho, visto que ainda há pouco entendimento a este respeito.

.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antifúngica de punicalagina, composto fenólico extraído da folha de *L. pacari*, em leveduras de espécies do complexo *C. neoformans* e em espécies de *Candida.*

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) da punicalagina em leveduras de espécies do complexo *C. neoformans* e de espécies de *Candida*.

2- Conhecer a cinética de crescimento das leveduras do complexo de espécies *C. neoformans* e de espécies *Candida* em presença de punicalagina.

3- Determinar o mecanismo de ação da punicalagina em células do complexo *C. neoformans* e *C. albicans* por meio de:

   a- Doseamento de ergosterol;

   b- Avaliação morfológica das células fúngicas por microscopia eletrônica de varredura e de transmissão;

   c- Análise por citometria de fluxo do ciclo celular, da membrana citoplasmática, do potencial membrana mitocondrial e do estresse oxidativo mitocondrial.

4- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* de punicalagina em fibroblastos de camundongos Balb/c, células de adenocarcinoma pulmonar A549 e em eritrócitos de carneiro.

4 MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DE PUNICALAGINA

As folhas de *L. pacari* foram coletadas no município de Caldazinha, estado de Goiás (16º 39' 54,5" Sul, 49º 00' 03,9" Oeste, 1.100 m de altitude), no mês de dezembro de 2011. O material vegetal foi identificado pelo Prof. Dr. José Realino de Paula da Universidade Federal de Goiás e uma exsicata foi depositada no herbário dessa instituição, sob registro UFG/47581. A punicalagina extraída do extrato de acetona: água 70:30 das folhas de *L. pacari* A. St.-Hil (Lythraceae) foi caracterizada por avaliações espectroscópicas de RMN de HPLC/UV e ESI-TOF, 1D e 2D como descrito por Carneiro et al. (2016).

4.2 ISOLADOS

As leveduras utilizadas neste estudo incluem: *C. neoformans* ATCC 28957, *C. gattii* ATCC 24065, seis isolados clínicos do complexo de espécies de *C. neoformans* (três *C. gattii* - L1, L9 e L20 e três *C. neoformans* - L3, L29 E L30), bem como *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e quatro isolados clínicos de espécies de *Candida* (dois *C. parapsilosis* - 21 e 77, um *Candida guilliermondii* - 97 e um *C. albicans* - 111). Esses isolados pertencem à micoteca do laboratório de micologia da UFG e são provenientes de trabalhos anteriormente realizados com aprovação dos Comitês de Ética do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (UFG-GO) e Hospital de Doenças Tropicais de Goiás, Dr. Anuar Auad (HDT/HAA) (Anexos A e B).

4.3 TESTE DE SUSCETIBILIDADE *IN VITRO*

Os testes de suscetibilidade *in vitro* constituem uma ferramenta importante na escolha do melhor tratamento, uma vez que, determinam os padrões de sensibilidade do microrganismo ao fármaco ou ao composto utilizado. No presente estudo, o teste de suscetibilidade foi realizado por microtitulação em caldo usando a metodologia padronizada para leveduras descrita nos documentos M27-A3 e M27-S4, propostos pelo CLSI (2008, 2012).

4.3.1 Preparo do inóculo

As células de leveduras do complexo *C. neoformans* e *Candida* sp. foram suspensas em solução salina 0,85%, medidas no espectrofotômetro a uma transmitância de 85% em comprimento de onda (λ) de 530 nm que corresponde a aproximadamente a 1 a $5x10^6$ Unidades Formadoras de Colônia/mL (UFC/mL). A partir deste inóculo padrão fez-se duas diluições seguidas 1:50 e 1:20 em meio RPMI (*Royal Park Memorial Institute*) de modo a permitir uma concentração final do inóculo de 0,5 a $2,5x10^3$ UFC/mL.

4.3.2 Procedimento do teste de microdiluição em caldo

O composto punicalagina foi primeiramente dissolvido em água destilada e em seguida diluído em caldo RPMI obtendo-se concentração inicial de 256 µg/mL e diluído ao dobro neste caldo até uma concentração de 0,25 µg/mL.

Em uma placa de microtitulação de 96 orifícios de fundo chato foram distribuídos 100µL do meio RPMI, a partir da segunda até a 10ª coluna. Em seguida, foram distribuídos 200µL do composto nos orifícios da primeira coluna da placa e realizada diluições seriadas. Em seguida 100µL do inóculo foram adicionados em cada orifício, de tal modo que as concentrações do composto variaram de 128 a 0,125 µg/mL. Estas placas foram incubadas a 35ºC por 72 horas para espécies do complexo *C. neoformans* e por 48 horas para espécies de *Candida*. Anfotericina B e fluconazol foram usados como controle. O esquema do teste de suscetibilidade *in vitro* é mostrado na Figura 4.

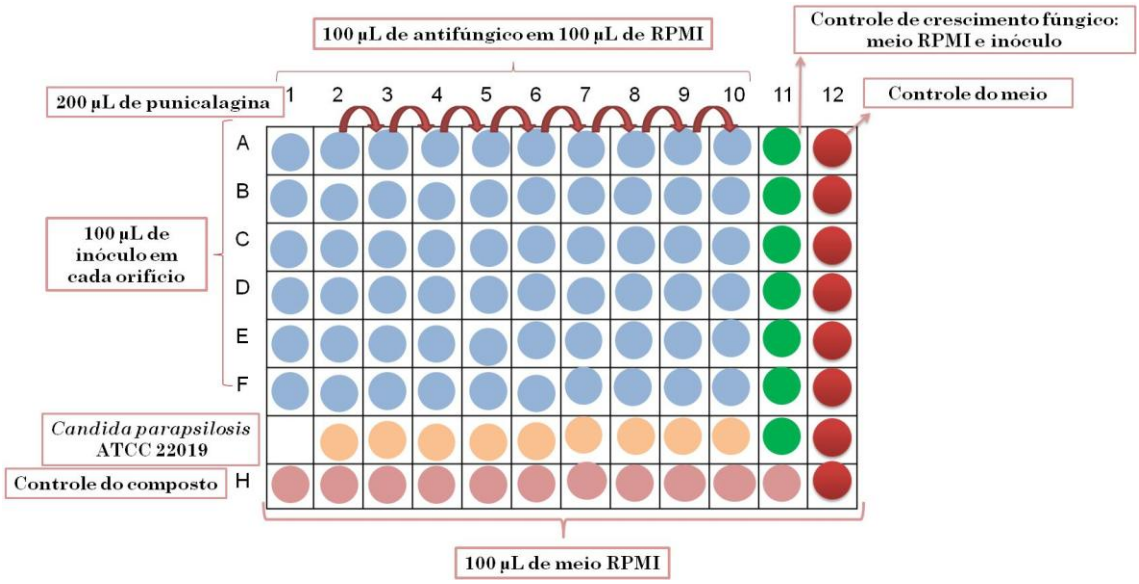

Figura 4 - Etapas de procedimento do teste de microdiluição em caldo segundo metodologia padronizada para leveduras proposta pelo CLSI (2008, 2012).

4.3.3 Interpretação dos resultados

A determinação da CIM foi verificada pela menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento total do microrganismo. O experimento foi realizado em triplicata, sendo que *C. parapsilosis* ATCC 22019 foi utilizada como controle de CIM, segundo o CLSI (CLSI, 2008).

4.4 ENSAIOS DE CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

Para a determinação da CFM, 10 µL da CIM do composto e quatro concentrações imediatamente superiores foram semeadas em placas de Petri contendo ágar *Sabouraud* dextrose (ASD). As placas foram incubadas a 35ºC por 72 horas para espécies do complexo *C. neoformans* e 48 horas por 35 °C para espécies de *Candida*. A CFM foi definida como a menor concentração da punicalagina que resultou no crescimento de até duas colônias, que representam a morte de mais de 99% do inóculo inicial das leveduras (DE LOGU et al., 2005; ENDO et al., 2010).

4.5 CINÉTICA DE CRESCIMENTO/ CURVA DE MORTE

O estudo do efeito da punicalagina sobre a cinética de crescimento que oferece informação da dinâmica do tempo de ação de um antifúngico sobre as leveduras (PAPPALARDO, 2009) foi realizado através do método de contagem de células viáveis, na presença do composto em intervalos periódicos de incubação. Esse ensaio,

que recebe a denominação de curva de morte fúngica foi realizado segundo Klepser et al. (1997) e Lemos et al. (2009).

A curva de morte foi realizada para as cepas padrão *C. neoformans* ATCC 28957 e *C. gattii* ATCC 24065, *C. albicans* ATCC 90028 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 na presença de punicalagina. Os isolados de leveduras do complexo *C. neoformans* foram cultivados em ASD por 48 horas e as espécies do gênero *Candida* por 24 horas e mantidos a uma temperatura de 35 °C. Os inóculos destas leveduras foram obtidos pela diluição em salina (0,85%), e as suspensões ajustadas por espectrofotometria para uma transmitância de 85% em comprimento de onda de 530 nm de modo a conter aproximadamente 1 a $5x10^6$ UFC/mL. Diluições de 1/10 em caldo RPMI foram realizadas as partir destas suspensões de tal modo a obter-se a concentração inicial de 1 a $5x10^5$ UFC/mL. A suspensão fúngica, acrescida de RPMI foi adicionada de punicalagina de modo a obter concentrações de ½CIM, CIM e 2x CIM deste composto. Alíquotas de 10 µL dessa suspensão foram plaqueadas em ASD e incubadas a 35 °C. Este procedimento foi considerado tempo zero (T0) de incubação do controle. Os frascos de erlenmeyer contendo as diferentes concentrações do composto e as suspensões fúngicas foram incubados sob agitação em 200 rotações por minuto (rpm), por 72 horas para espécies do complexo *C. neoformans* e por 48 horas para leveduras do gênero *Candida* a 35 °C em caldo RPMI. O mesmo procedimento foi realizado para as amostras controle. Após tempo de incubação pré-determinados de 6, 12, 24, 48 e 72 horas para espécies do complexo *C. neoformans* e de 3, 6, 12, 24 e 48 horas para leveduras do gênero *Candida*, 100 µL dessas amostras foram coletados e diluídos de 10^{-2} a 10^{-5} em caldo RPMI, semeados em estrias em placas de Petri contendo ASD e incubados por 72 horas para espécies do complexo *C. neoformans* e por 48 horas para leveduras do gênero *Candida*. Teste de verificação de curva de morte foi feito com fluconazol e anfotericina, onde concentrações equivalentes a CIM destes antifúngicos foram adicionados aos inóculos fúngicos.

A média da contagem de colônias (realizadas em duplicata), de cada diluição em tempos diferentes foi inserida em um gráfico, o qual permitiu a comparação entre os diferentes tratamentos com o composto.

Segundo Klepser et al. (1998), um composto é fungicida se apresentar uma redução ≥99,9 % em UFC/mL do inóculo inicial, valor de referência considerado no presente trabalho.

4.6 DOSEAMENTO DE ERGOSTEROL

O doseamento de ergosterol pode auxiliar na elucidação do mecanismo de ação do composto sobre células fúngicas, pois o conteúdo de ergosterol intracelular extraído da célula crescida na presença do composto, pode ser alterado sob a ação de agentes antifúngicos (PIMENTA, 2008).

O total de esterois intracelular foi extraído conforme o método descrito por ARTHINGTON-SKAGGS et al., (1999) com algumas modificações. Uma colônia fúngica de *C. gattii* ATCC 24065 e uma de *C. albicans* ATCC 90028 crescidas em ASD foram inoculadas em erlenmeyers contendo 50 mL caldo *Sabouraud* dextrose na presença do composto ou de fluconazol (controle positivo) em concentrações de inibição dos microrganismos e em concentração subinibitória de 1/2 CIM, incubados por 48 horas para *C. gattii* e por 16 horas para *C. albicans* em agitação de 200 rpm a 35ºC. Leveduras sem adição do composto foram usadas como controle negativo.

Em seguida a suspensão de células foi transferida para tubos Falcon e centrifugada a 3.700 rpm durante 10 min. A massa de células foi precipitada e o sobrenadante foi descartado. Os tubos foram pesados e em seguida, homogeneizou-se as células em 3 mL de solução alcoólica de potássio (25 g de hidróxido de potássio [KOH], 35 mL de água destilada e álcool 100% - qsp 100 mL) e incubou-se em banho-maria a 85ºC para *C. gattii* por 4 horas e para *C. albicans* por 1 hora.

Após resfriamento, a extração por partição foi feita com a adição de 1 mL de água destilada esterilizada e de 3 mL de heptano em cada tubo e a suspensão foi submetida à agitação durante 3 min. Os tubos foram então mantidos em temperatura ambiente, e verificou-se a formação da fase aquosa, constituída por água e outros resíduos celulares, e da fase lipofílica, formada pelo heptano saturado em água e ergosterol.

A fase lipofílica foi retirada e armazenada em tubos de ensaio a 20 °C por 24 horas. As amostras foram diluídas em álcool 100% (1/5) e analisadas em espectrofotômetro em um intervalo de 230 a 300 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata.

O ergosterol e o 24(28)-dihidroergosterol (24[28]-DHE) são absorvidos a 281,5 nm, portanto, a quantidade total desses esterois produzida por um isolado pode ser calculada da seguinte forma:

% ergosterol + % 24(28)-DHE = [(A $_{281.5}$/290)xF]/ massa *pellet*

Onde:

F= fator de diluição em etanol,

290=valor de E (em percentual por centímetro) determinado pelo ergosterol cristalino. Sabendo que apenas o 24(28) DHE é absorvido a 230nm, o cálculo é realizado com valores de absorbância obtidos neste espectro de absorção, segundo fórmula abaixo:

% 24(28) DHE = [$A_{230/518}$ xF] / massa *pellet*

Onde:

F= fator de diluição em etanol

518 são os valores de E (em percentual por centímetro) determinado pelo 24(28)-DHE.

Logo, para obter a quantidade de ergosterol produzida subtrai-se do total de esterois produzidos o valor obtido apenas pelo 24(28)-DHE

% Ergosterol = [% ergosterol - % 24(28)-DHE].

4.7 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS

Os isolados *C. neoformans* ATCC 28367, *C. gattii* ATCC 24065 e *C. albicans* ATCC 90028 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 sob a ação de punicalagina foram submetidos à microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) para detecção de possíveis alterações celulares.

4.7.1 Microscopia eletrônica de varredura

Para a análise da morfologia e de alterações na superfície das células foi utilizada a metodologia proposta por Faganello et al. (2006). As amostras fúngicas foram cultivadas em placas de Petri contendo ASD acrescido de punicalagina na CIM. Como controle negativo foram utilizadas amostras cultivadas em ASD sem tratamento.

Após o cultivo, um pequeno bloco de cada amostra fúngica foi retirado e colocado em eppendorfs com fixador (2% de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído em 0,1 M de tampão cacodilato de sódio a pH 7,2 acrescido de 3% de sacarose) e mantidos em *overnight* a 4 °C.

Em seguida, as amostras foram lavadas com tampão cacodilato por quatro vezes durante 15 min e desidratadas em álcool etílico em uma série gradual de concentrações

de 30, 50, 70, 80, 90% durante 15 min cada e, para o álcool 100%, foram realizadas duas lavagens de duração de 10 min cada. Após a desidratação alcoólica, as células foram secadas no aparelho de ponto crítico (Autosamdri®, 815, Series A) por 40 min, fixadas no porta amostra (*stub*) com auxílio da fita de carbono dupla-face, recobertas com uma camada de ouro (*Denton Vacuum, Desk V*) e posteriormente analisadas por microscopia eletrônica de varredura (*Jeol, JSM – 6610, equipado com EDS, Thermo Scientific NSS Spectral Imaging*).

4.7.2 Microscopia eletrônica de transmissão

A análise ultraestrutural das células fúngicas antes e após tratamento foi realizada utilizando a metodologia de BRITO; LINO-NETO; DOLDER (2009). As amostras fúngicas foram cultivadas em placas de Petri contendo ASD acrescido de punicalagina de forma a conter uma concentração correspondente à sua CIM. Como controle negativo foram utilizadas amostras cultivadas em ASD sem composto.

Após a incubação por 24 horas, um pequeno fragmento de ASD de cada placa foi retirado e transferido para tubos de eppendorf de 1,5 mL. Em seguida, o fragmento foi fixado em glutaraldeído 2,5 %, diluído em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7.2 contendo ácido pícrico 0,2%, durante 24 horas, a 4°C. Após duas lavagens em tampão cacodilato por 10 min, o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas. Posteriormente, os fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 90 e 95%) por 15 min cada e 3 vezes a 100% por 10 min e incluídos em resina Epon, mantidos em *overnight* em temperatura ambiente e submetidos a secções de cortes. As secções semifinas (1 µm) e ultrafinas (70 nm) foram obtidas em ultramicrótomo (Leica EM UC7®). As telas de cobre contendo os cortes ultrafinos foram contrastadas com solução de acetato de uranila a 2% por 20 min, lavadas em água bidestilada, mergulhadas em solução de citrato de chumbo a 2% durante 6 min e submetidas a nova lavagem. A análise ultraestrutural dos cortes foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão Jeol, JEM-2100®, equipado com *EDS, Thermo Scientific*®.

4.8 ENSAIOS UTILIZANDO CITOMETRIA DE FLUXO

A análise do ciclo celular, da permeabilidade da membrana, do estresse oxidativo pelo aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO)

intracelulares e do potencial de membrana mitocondrial de punicalagina sobre isolados de *C. gattii* e *C. albicans* foram realizadas utilizando citômetro de fluxo (BD FACSCANTO II®, BD Biosciences®, NJ, EUA).

A preparação do inóculo e posterior tratamento com punicalagina para todos os experimentos utilizando citometria de fluxo foram realizados segundo a metodologia proposta por Ahmad et al. (2011), com modificações. Os isolados de *C. gattii* ATCC 24065 e de *C. albicans* ATCC 90028 foram cultivados em ASD dextrose por 48 e 24 horas, respectivamente, inoculados em 10 mL de caldo RPMI e incubados overnight. O inóculo destas células foi preparado em caldo RPMI e ajustado por espectrofotometria a um λ de 530 nm e transmitância de 85% de tal modo a se obter uma concentração de aproximadamente $1x10^6$ células/mL e em seguida a punicalagina foi adicionada de tal forma a se obter concentrações correspondentes a 4x CIM e CIM. Os tubos contendo a suspensão de leveduras e o composto em diferentes concentrações foram incubados em movimentos rotatórios de 200 rpm durante 2 horas a 35 °C. Em seguida, as células foram centrifugadas por 5 min a 5.000 rpm, o *pellet* foi ressuspendido em 5 mL de PBS pH 7,2, centrifugado novamente por 5 min a 5.000 rpm e o conteúdo, após agitação em vórtex foi transferido para eppendorfs. As células foram centrifugadas por 10 min a 5.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o *pellet*, ressuspendido em 200 µL de PBS. Como controle positivo foi utilizado anfotericina B na concentração correspondente a 2 µg/mL e o controle de autofluorescência foi verificado usando-se inóculo e RPMI sem marcador. Para cada ensaio, foram realizados três experimentos independentes, sendo adquiridos 10 mil eventos numa população previamente determinada (*gate*).

4.8.1 Avaliação do ciclo celular

Para análise das fases do ciclo celular, foi usado o iodeto de propídio (IP) que é um fluorocromo capaz de se ligar a molécula de ácido desoxirribonucléico (DNA) e identificar com precisão as células em todas as fases do ciclo celular. Desta forma o efeito de punicalagina nas diferentes fases do ciclo celular das leveduras foi obtido usando-se o IP (RICCARDI; NICOLETTI, 2006).

O *pellet* de leveduras tratadas com punicalagina obtido conforme descrito no item acima foi centrifugado a 5.000 rpm durante 5 min, lavado com 1 mL PBS gelado e fixado com 1 mL de etanol gelado a 70%. As amostras foram incubadas por um período de 24 horas, a 4ºC e após esse tempo os tubos foram centrifugados a 5.000 rpm durante

5 min. As células foram lavadas duas vezes com 1 mL PBS gelado, centrifugadas por 5 min e ao *pellet* foram adicionados 400 µL (0,5 mg/mL) de solução contendo RNAse (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Após a incubação de 1 hora a 37°C, as células foram centrifugadas a 5.000 rpm por 5 min e acrescentado 200 µg/mL (5 µg/mL) IP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em cada tubo e incubadas novamente por 15 min.

Após a incubação, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, a intensidade de fluorescência foi determinada no citômetro de fluxo, e realizada a análise através de formação de histogramas que mostraram as diferentes fases do ciclo celular (G0/G1, S e G2/M).

4.8.2 Avaliação da permeabilidade da membrana

A ação da punicalagina sobre a membrana celular foi determinada pela metodologia proposta por Ahmad et al. (2011), com modificações, onde se utiliza o IP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) como marcador de integridade de membrana citoplasmática, usado para corar as células não viáveis. O corante penetra nas células com membranas danificadas e liga-se ao DNA, emitindo fluorescência. Em células íntegras, esse corante não penetra a membrana citoplasmática e não apresenta fluorescência (PINA-VAZ et al., 2001).

Às leveduras foram adicionados 100 µL de PBS contendo IP (2µg/mL). Os eppendorfs contendo o IP e células tratadas foram agitados por dez segundos e incubados por 30 min a 35°C ao abrigo da luz, e em seguida, foi realizada a leitura no citômetro de fluxo, onde se observou a porcentagem de células coradas (lesão de membrana) e não coradas pelo corante IP.

4.8.3 Avaliação de estresse oxidativo pelo aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) intracelulares

A avaliação do aumento da geração de ERO foi realizada segundo Mesa-Arango (2014) com modificações. Nesta metodologia usou-se o corante 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) que é uma sonda não fluorescente, que penetra no interior das células e na presença de ERO sofre oxidação. Esse corante é estável, lipofílico e atravessa facilmente a membrana das células. As ERO geradas no interior das células oxidam DCFH-DA formando a 2',7'-

diclorofluoresceína (DCF). A intensidade de fluorescência verde produzida pela formação de DCF é proporcional à capacidade oxidativa da célula, ou seja, à quantidade de ERO produzida (THANNICKAL; FANBURG, 2000; MESA-ARANGO et al., 2014).

Nesse ensaio, as leveduras foram tratadas com punicalagina por 2, 6 e 24 horas. Neste experimento em que se utilizou a incubação por 24 horas a concentração celular utilizada foi de $1x10^3$ células/mL, pois a concentração inicialmente proposta de 10^6 células/mL não permitia a leitura no citômetro de fluxo.

Após o tempo estabelecido de incubação, as células foram centrifugadas a 5.000 rpm por 5 min e incubadas com 300 µL de DCFH-DA a 10 µM, durante 30 min a 35 °C. Posteriormente, as células foram lavadas com 1 mL de PBS, centrifugadas a 5.000 rpm e ressuspendidas com 200 µL de PBS para serem analisadas em citômetro de fluxo.

4.8.4 Avaliação da perda de potencial da membrana (ΔΨm)

A perda do potencial da membrana mitocondrial foi avaliada utilizando a rodamina 123 (Rh-123), corante fluorescente nucleofílico, permeável à membrana plasmática. O corante é rapidamente sequestrado por mitocôndrias com potencial de membrana inalterado, acumula no interior dessa organela, e emite, assim, alta fluorescência. Em células com potencial de membrana alterado ocorre o efluxo desse corante, emitindo menor fluorescência do que quando comparado às mitocôndrias de células normais (ARAÚJO, 2013).

Às células tratadas com punicalagina foram adicionados 2 µL (10 µM) de Rh-123 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e incubadas durante 15 min a 35 °C. Estas células foram então centrifugadas a 5.000 rpm por 5 min, e em seguida foram realizadas duas lavagens com 1 mL de PBS, as células foram centrifugadas a 5.000 rpm por 5 min e ressuspendidas com 200 µL de PBS para serem analisadas em citômetro de fluxo.

4.9 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DE PUNICALAGINA

4.9.1 Obtenção, cultivo e viabilidade das células de Linhagens 3T3 e A549

As linhagens 3T3 provenientes de fibroblastos de camundongos Balb/c (Banco de Células do Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e as células pulmonares de epitélio alveolar humano A549 (gentilmente cedida pela Dra. Elisa Raquel Anastácio Ferraz Avelino da

Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foram usadas para verificar a citotoxicidade *in vitro* do composto, punicalagina.

As células Balb/c 3T3 e A549 foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) e *Ham's Nutrient Mixture F12 liquid* (HAM'S-F12), respectivamente, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2 mM L-glutamine, 4,5 mM HEPES, 0,17 M bicarbonato de sódio, 100 UI/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina. Essas linhagens foram mantidas em garrafas de cultura celular (75 cm^2) e armazenadas em estufa contendo ambiente umidificado, CO_2 a 5% e temperatura de 37ºC.

As células aderidas foram retiradas da garrafa de cultura quando a confluência celular atingiu cerca de 70-80%. Desta forma este ensaio foi realizado da seguinte maneira. Primeiramente, o meio de cultura utilizado para crescimento celular foi descartado; em seguida as células foram lavadas com tampão PBS; e adicionadas de 1 mL de solução contendo PBS e tripsina (0,025%)/EDTA (0,02%) (1:1, v/v), as garrafas foram incubadas na estufa a 37ºC por 3-5 min até ocorrer desadesão das células. Após incubação, a solução contendo tripsina foi inativada usando 5 mL de solução de neutralização (2% de SFB e 90% de meio). O conteúdo da garrafa foi transferido para um tubo de polipropileno e centrifugado por 5 min, a 1.500 rpm a 25ºC. O sobrenadante foi descartado por inversão e ressuspendido com 1 mL de meio para contagem celular.

O número de células viáveis foi estimado pelo método de exclusão do corante azul de tripano. Esse método baseia-se na observação de que células viáveis são impermeáveis ao corante, ao passo que as células não viáveis, por estarem com a membrana rompida, permitem a penetração do corante no interior celular e corando, assim, as células de azul (STROBER, 2001). Para a contagem das células viáveis, 20 µL da suspensão celular foram homogeneizados com 20 µL de corante azul de tripano, e analisados utilizando o contador celular automático TC20 (Bio-Rad®, CA, EUA). Viabilidade celular superior a 90% foi considerada satisfatória para realização dos ensaios.

4.9.1.1 Avaliação do potencial de citotoxicidade em células 3T3

A citotoxicidade da punicalagina em cultura de células de fibroblastos Balb/c 3T3 foi obtida através da incorporação do corante vermelho neutro (2-amino-3-metil-7-dimetil-amino-cloreto de fenzina), que consiste em avaliar a capacidade das células

viáveis para incorporar e vincular o corante vermelho neutro nos lisossomos (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008; PRIETO et al., 2013).

Suspensão de células 3T3 contendo $3x10^4$ células/mL foi adicionada em meio DMEM suplementado com 10% SFB e distribuídas nos orifícios centrais da placa de 96 orifícios. Nos orifícios periféricos da placa foram colocados 100 µL do meio (branco controle). As placas foram incubadas por 48 horas a 37ºC em estufa de CO_2 a 5 % para que as células formassem uma monocamada celular.

Após este período de incubação, que assegura a recuperação das células, sua aderência e progressão para a fase de crescimento exponencial, desprezou-se a solução sobrenadante dos orifícios e a citotoxicidade da punicalagina e da anfotericina B foi verificada acrescentando-se 100 µL de nove diferentes concentrações do composto e do fármaco (0,78 - 200 µg/mL) diluídos em meio DMEM suplementado com 10% de SFB (Figura 5).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BC	BC	BP	BP	BP	BP	BP	BP	BP	BP	BP	BC
B	BC	Controle	0,78	1,56	3,13	6,25	12,5	25	50	100	200	BC
C	BC	Controle	0,78	1,56	3,13	6,25	12,5	25	50	100	200	BC
D	BC	Controle	0,78	1,56	3,13	6,25	12,5	25	50	100	200	BC
E	BC	Controle	0,78	1,56	3,13	6,25	12,5	25	50	100	200	BC
F	BC	Controle	0,78	1,56	3,13	6,25	12,5	25	50	100	200	BC
G	BC	Controle	0,78	1,56	3,13	6,25	12,5	25	50	100	200	BC
H	BC	BC	BA	BA	BA	BA	BA	BA	BA	BA	BA	BC

Figura 5 - Representação esquemática dos grupos de tratamento com punicalagina e anfotericina B em placa de 96 orifícios para ensaio de citotoxicidade em células Balb/c 3T3. A cor cinza claro representa os orifícios tratados com punicalagina em diferentes concentrações e a cor cinza escuro representa os orifícios tratados com anfotericina B. BC: branco do controle (meio DMEM e SFB); BP: Branco (controle de punicalagina) e BA: Branco (controle de anfotericina B). Controle: meio contendo células Balb/c 3T3.

As placas foram incubadas por 48 horas a 37ºC em estufa de CO_2 a 5%. Após este período, as soluções foram retiradas dos orifícios que foram adicionados de 250 µL/orifício de corante vermelho neutro (25 µg/mL), 5% de SFB e meio DMEM, e incubou-se a placa por 3h. A solução contendo vermelho neutro foi removida e as células cuidadosamente lavadas com 250 µL/orifício de PBS. O PBS foi desprezado da placa e em seguida, adicionou-se 100 µl da solução reveladora contendo 1% de ácido acético glacial, 50% de etanol P.A e 49% de água deionizada. As placas foram submetidas à agitação por 20 min a 30 rpm para extração do vermelho neutro. A leitura da absorbância (Abs) de cada orifício foi medida por espectrofotometria usando um

comprimento de onda de 540 nm. A leitura da Abs de células 3T3 sem punicalagina foi usada como controle (Abs de controle). Os testes foram realizados em sextuplicata em três experimentos independentes.

Para análise dos dados, a viabilidade celular foi determinada pela seguinte fórmula: Viabilidade (%) = (Abs $_{tratado}$ - Abs $_{branco/}$ Abs $_{controle}$ - Abs $_{branco}$) x 100. Uma curva concentração - resposta foi obtida para determinação do valor de concentração da substância que inibi 50% do crescimento celular (IC_{50}).

4.9.1.2 Avaliação do potencial de citotoxicidade em células A549

Esse ensaio foi conduzido utilizando o método de redução do sal de tetrazólio (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio [MTT]) segundo Mosmann (MOSMANN, 1983), com algumas modificações. Em células viáveis, o MTT é clivado pela enzima mitocondrial, succinato desidrogenase, produzindo cristais azuis de formazana, formadas proporcionalmente ao número de células metabolicamente ativas (MOSMANN, 1983; NOGUEIRA et al., 2008).

Nesse experimento, 100 µL de suspensão celular ($1x10^5$ células/mL em meio completo) foram adicionados nos orifícios interiores de cada placa de 96 orifícios. O mesmo volume de meio foi adicionado nos orifícios periféricos da placa. Após incubação de 24 horas, o sobrenadante de cada orifício foi desprezado e os grupos celulares foram incubados novamente com meio completo (grupo controle) ou nove diferentes concentrações (0,78 - 200 µg/mL) de punicalagina ou anfotericina B em meio completo (Figura 5).

Após período de incubação de 45 horas, 10 µL de MTT (5 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foram adicionados a cada orifício e a placa novamente incubada por um período adicional de 3 horas. Posteriormente, o sobrenadante de toda a placa foi retirado, e 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados em cada orifício para a solubilização dos cristais de formazana formados. As placas foram submetidas à agitação por 20 min a 30 rpm para promover a solubilização dos cristais de formazana. A leitura da absorbância (Abs) foi feita em espectrofotômetro de placa (Thermo Scientific Multiskan® Spectrum, MA, EUA) com comprimento de onda de 560 nm.

A absorbância obtida das células-controle foi considerada como 100% de viabilidade celular e a viabilidade dos grupos de tratamento calculada através da seguinte equação:

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{Abs\ tratado - Abs\ branco}{Abs\ controle - Abs\ branco} \times 100$$

Os testes foram realizados em sextuplicata em três experimentos independentes. O esquema usado para verificar a citotoxicidade para as células A549 foi realizado da mesma forma como o procedimento descrito para as células 3T3.

4.9.2 Ensaio hemolítico

O composto foi avaliado quanto a sua capacidade de causar lise nas hemácias, liberando hemoglobina, conforme He et al. (2007) com modificações. Hemácias de carneiro contendo o anticoagulante EDTA foram utilizadas, sendo que os eritrócitos foram lavados três vezes em PBS pH 7,4. O *pellet* obtido foi então adicionado de 20 mL de PBS (diluição 1:5), para ressuspender as hemácias. Concomitantemente, foram preparados punicalagina ou anfotericina B em tampão PBS em concentrações que variaram de 256 µg/L a 1 µg/L ou 8µg/L a 0,031 µg/L respectivamente. Posteriormente, colocou-se 50 µL da suspensão de hemácias em cada eppendorf contendo punicalagina ou anfotericina B e incubou-se em shaker por 30 min. Após incubação as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 5 min e 80 µL do sobrenadante de cada concentração foi transferido para uma placa de microtitulação. Como controle positivo utilizou-se Triton X-100 diluído a 1 % com hemácias e como controle negativo solução de hemácias com PBS. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro usando comprimento de onda de 450 nm. A porcentagem de hemólise foi realizada pela seguinte fórmula:

$$\%\ \text{hemólise} = \frac{\text{Abs}_{\text{amostra tratada com composto}} - \text{Abs}_{\text{amostra tratada com PBS}}}{\text{Abs}_{\text{solução triton}} - \text{Abs}_{\text{amostra tratada com PBS}}} \times 100$$

O experimento foi realizado em sextuplicata em três eventos independentes (Figura 6).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BC	BC	BP	BP	BP	BP	BP	BP	BP	BP	BP	BC
B	BC	Controle	1	2	4	8	16	32	64	128	256	BC
C	BC	Controle	1	2	4	8	16	32	64	128	256	BC
D	BC	Controle	1	2	4	8	16	32	64	128	256	BC
E	BC	Controle	0,031	0,625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	BC
F	BC	Controle	0,031	0,625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	BC
G	BC	Controle	0,031	0,625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	BC
H	BC	BC	BA	BA	BA	BA	BA	BA	BA	BA	BA	BC

Figura 6- Representação esquemática dos grupos de tratamento com punicalagina e anfotericina B em placa de 96 orifícios para ensaio hemolítico. Tratamento A, cor cinza claro representa os orifícios tratados com punicalagina e a cor cinza escuro representa os orifícios tratados com anfotericina B. BC: branco do controle (Triton X-100); BP: branco (controle de punicalagina); BA: branco (controle de anfotericina B).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram processados utilizando *software* GraphPad Prism 5.01® (San Diego, CA, EUA) e expressos em média (± desvio padrão). A variação entre grupos foi analisada pelo teste de análise de variância (ANOVA), seguido dos testes *post-hoc* de Bonferroni ou Tukey. Foi estabelecida significância estatística de $p<0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 TESTE DE SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO*

A punicalagina mostrou atividade antifúngica sobre espécies do complexo *C. neoformans* verificando-se uma variação de CIM de 0,5 a 4,0 µg/mL e CFM > 256 µg/mL. Na concentração de 0,5 µg/mL o composto inibiu 37% (3/8) dos isolados de espécies do complexo *C. neoformans.*

As espécies de *Candida* apresentaram CIM de 4,0 µg/mL e CFM > 256 µg/mL quando expostas a punicalagina. Na concentração de 4,0 µg/mL o composto foi capaz de inibir 100% (6/6) dos isolados de espécies *Candida*. Os valores de CIM e de CFM de punicalagina para os isolados de leveduras estudados comparados com os valores obtidos para fluconazol e anfotericina B para estes mesmos isolados encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Concentração inibitória mínima (CIM) e fungicida (CFM) (µg/mL) da punicalagina sobre espécies do complexo *Cryptococcus neoformans* e espécies de *Candida*

Isolados	**Punicalagina**		**Fluconazol**		**Anfotericina B**	
	CIM	**CFM**	**CIM**	**CFM**	**CIM**	**CFM**
Cryptococcus sp.						
C. gattii L01	0,5	>256	2	8	0,25	0,5
C. gattii L09	0,5	>256	2	8	0,25	0,5
C. gattii L20	0,5	>256	4	16	0,5	0,5
C. neoformans L3	2	>256	2	8	0,5	1
C. neoformans L29	2	>256	2	8	0,125	0,125
C. neoformans L30	2	>256	2	4	0,125	0,125
C. gattii ATCC 24065	4	>256	8	8	0,5	1
C. neoformans ATCC 28957	4	>256	0,5	1	0,5	0,5
Candida sp.						
C. parapsilosis 77 U	4	>256	1	1	-	-
C. parapsilosis 21 X	4	>256	1	4	-	-
C. guilliermondii 97 U	4	>256	1	16	-	-
C. albicans 111 U	4	>256	4	8	-	-
C. albicans ATCC 90028	4	>256	1	64	-	-
C. parapsilosis ATCC 22019	4	>256	1	64	-	-

CIM: concentração inibitória mínima; CFM: concentração fungicida mínima; -: não realizado.

5.2 CINÉTICA DE CRESCIMENTO/CURVA DE MORTE

As leveduras do complexo *C. neoformans* tratadas com punicalagina nas concentrações correspondentes à CIM (4 µg/mL) e 2x CIM (8 µg/mL) apresentaram redução do número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) ao longo das 72 horas de tratamento em comparação com as leveduras não submetidas ao tratamento. A redução observada não foi estatisticamente significante. *C. neoformans* ATCC 28957 apresentou na concentração correspondente a 2x CIM maior redução do número de unidades formadoras de colônia por mililitros, mas essa diferença não foi estatisticamente significante. A anfotericina B apresentou sua atividade máxima fungicida a partir de 12 horas de incubação em concentrações equivalentes a 1 µg/mL para *C. gattii* ATCC 24065 e *C. neoformans* ATCC 28957. Na Figura 7 A e B é mostrada a curva de morte dos isolados de espécies do complexo *C. neoformans* para punicalagina e anfotericina B.

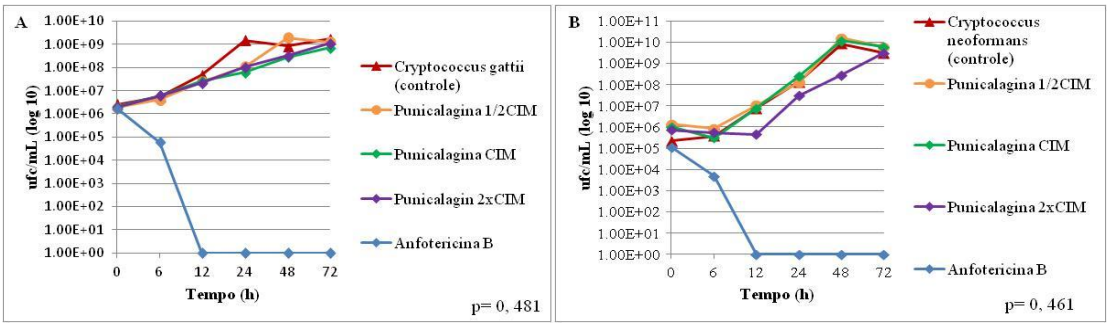

Figura 7- Curva de crescimento de *C. gattii* ATCC 24065 (A) e *C. neoformans* ATCC 28957 (B) sem tratamento e tratadas com punicalagina no valor correspondente a metade da concentração inibitória mínima (0,25 µg/mL), CIM (0,5 µg/mL) e 2x CIM (1 µg/mL), e com anfotericina B na CIM (0,5 µg/mL), após 72 horas de incubação.

As leveduras de espécies de *Candida* tratadas com punicalagina nas concentrações correspondentes à CIM e 2x CIM, apresentaram redução do número de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) ao longo das 48h de tratamento em comparação com as leveduras não submetidas ao tratamento. A redução de células, não foi estatisticamente significante quando comparadas às leveduras não submetidas a tratamento com o composto. A Figura 8 mostra a curva de morte dos isolados de espécies de *Candida* para punicalagina e fluconazol. A avaliação do efeito da punicalagina nos isolados de *Candida* mostrou redução <99,9% do inóculo inicial, demonstrando tendência a ser fungistática.

A atividade fungistática em concentração equivalente à CIM para leveduras do gênero *Candida* foi verificada entre seis e 24 horas de incubação. Foi possível observar que na ½ da concentração inibitória mínima não houve redução do número de UFC/mL. Espécies de *C. albicans* apresentaram maior redução do número de UFC/mL em relação à *C. parapsilosis* (Figura 8).

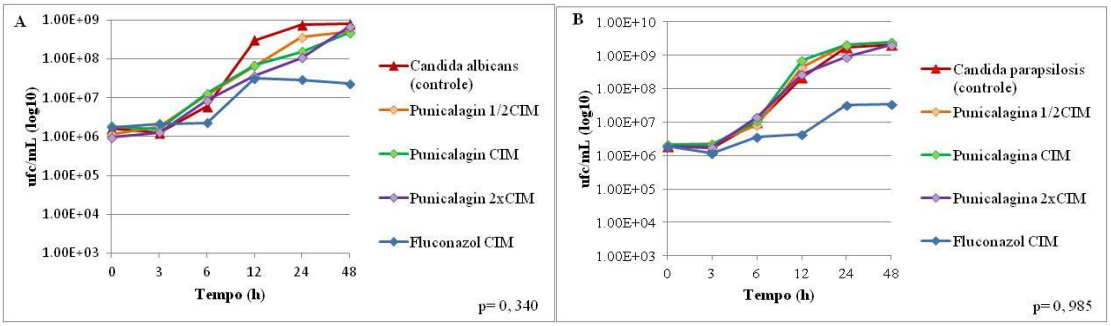

Figura 8 - Curva de crescimento de espécies de *C. albicans* ATCC 90028 (A) e de *C. parapsilosis* ATCC 22019 (B) sem tratamento e tratadas com punicalagina com valores correspondentes a ½ CIM (2 µg/mL), CIM (4 µg/mL) e 2x CIM (8 µg/mL) e com fluconazol na CIM (1 µg/mL) após 24 horas de incubação.

5.3 DOSEAMENTO DE ERGOSTEROL

A quantificação do ergosterol por espectrofotometria permitiu verificar a inibição da biossíntese de ergosterol, importante constituinte da membrana celular fúngica.

As células de *C. gattii* ATCC 24065 submetidas à ação de punicalagina ou de fluconazol reduziram a síntese de ergosterol. Em CIM houve redução de 34,08% (0,0076) de ergosterol comparada ao crescimento sem punicalagina/controle (0,01153), enquanto que em ½ CIM a redução foi de 18,8% (0,0093). Na Figura 9 são mostrados os perfis espectrofotométricos de punicalagina em comparação com o controle de crescimento.

C. albicans ATCC 90028 na presença de punicalagina reduziu os teores de ergosterol de 3,66% (0,0034) na ½ CIM de punicalagina e na CIM houve redução de 7,88% (0,0032) de ergosterol comparada ao crescimento do controle (0,0035) (Figura 9 B).

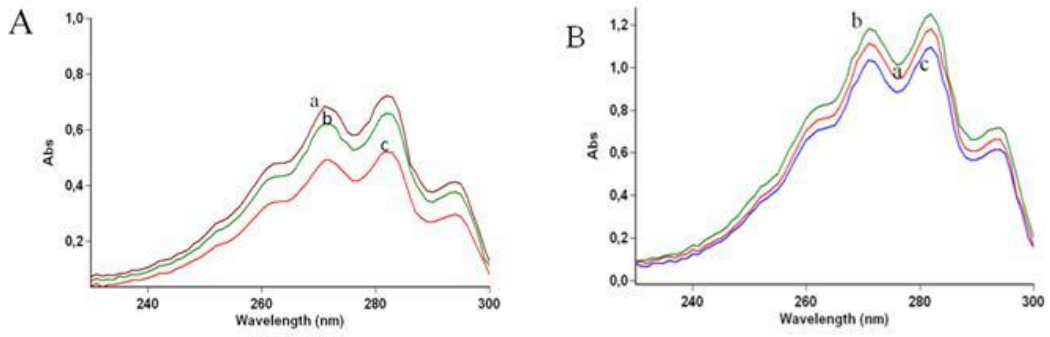

Figura 9 - Perfil de esterois analisados por espectrofotometria UV (230-300nm). (A) de *C. gattii* ATCC 24065 sem tratamento (a); na presença de punicalagina em concentrações de ½ CIM de 2 µg/mL; (b) e em CIM de 4 µg/mL (c); (B) de *C. albicans* ATCC 90028 sem tratamento (a), na presença de punicalagina em concentrações de ½ CIM de 2 µg/mL (b) e em CIM de 4 µg/mL (c)

5.4 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS

5.4.1 Microscopia eletrônica de varredura

A análise de microscopia eletrônica de varredura demonstrou que as células não tratadas de espécies do complexo *C. neoformans* apresentaram morfologia celular normal com parede lisa, corpos esféricos e estavam presentes em grandes quantidades como mostrado nas Figuras 10 e 11 (A, C e E). Nas espécies de *C. neoformans* tratadas com punicalagina verificou-se redução do número de células e as leveduras se tornaram murchas e com cápsula rugosa (Figuras 10 e 11 B, D e F).

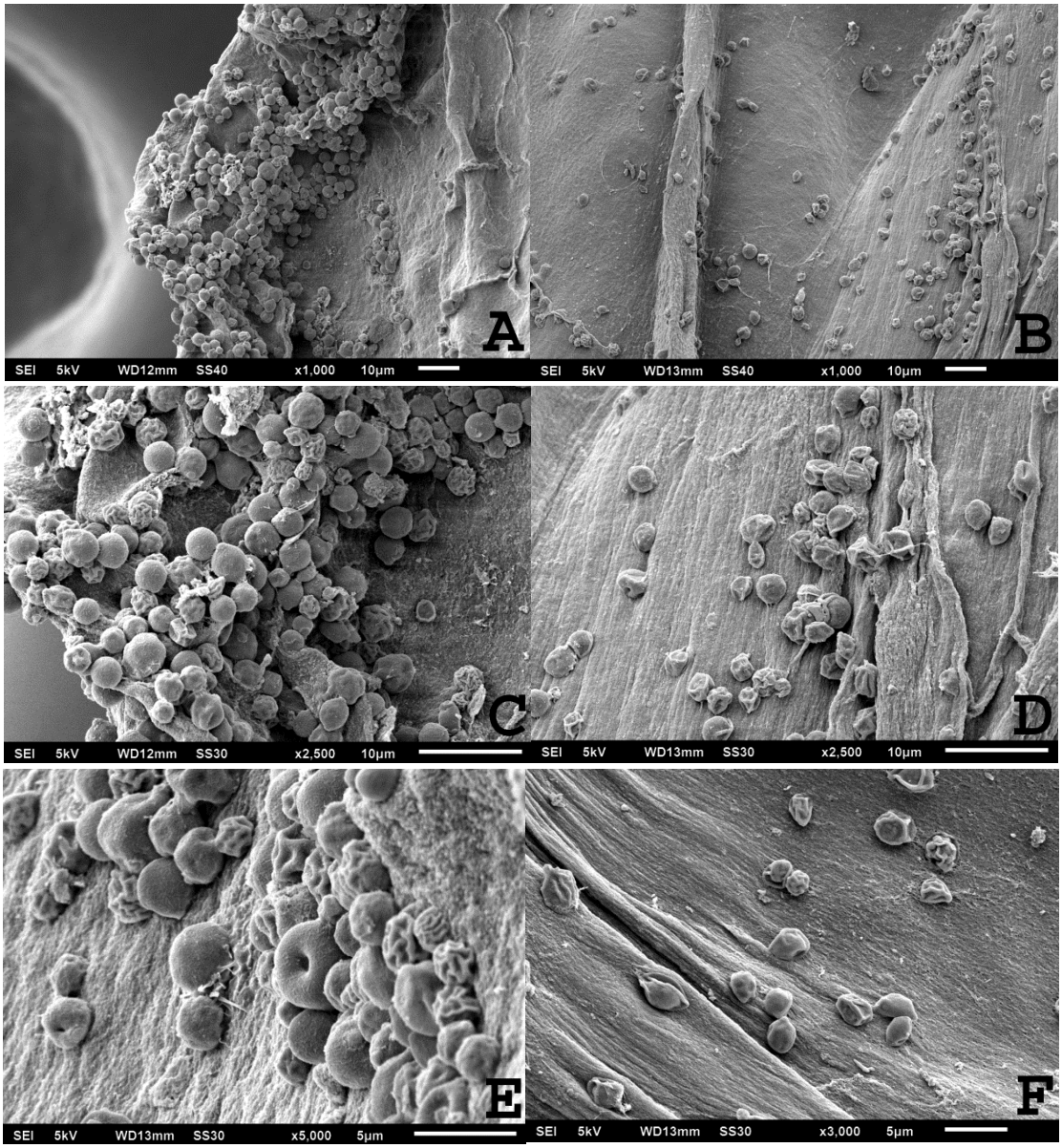

Figura 10 - Análise da morfologia celular de *C. neoformans* ATCC 28957. As células não tratadas com características ovóides e íntegras (A, C e E) e tratadas com punicalagina na CIM (4 µg/mL), leveduras murchas com cápsula rugosa (B, D e F).

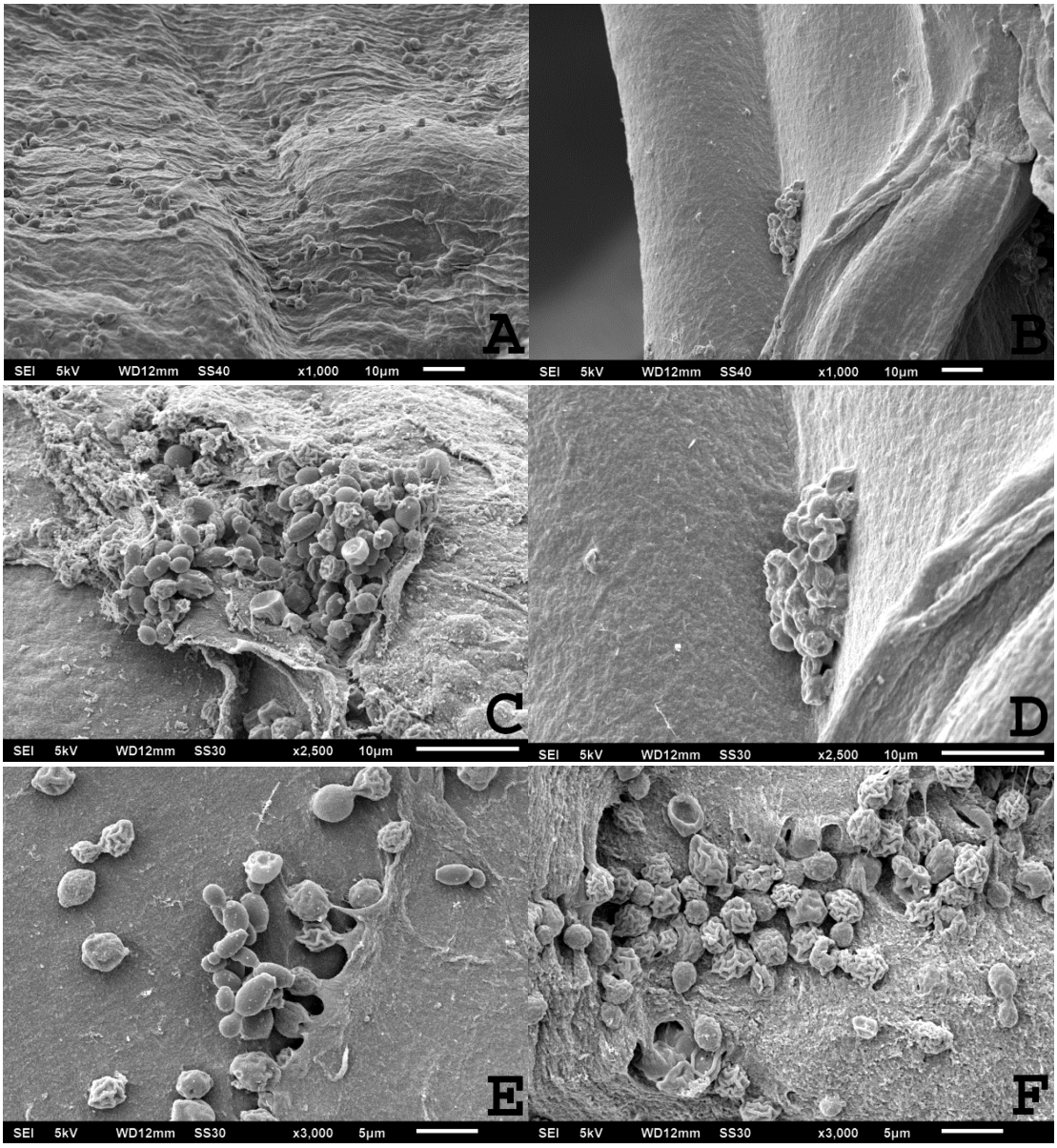

Figura 11 - Análise da morfologia celular de *C. gattii* ATCC 24065. As células não tratadas com características ovoides e íntegras (A, C e E) e tratadas com punicalagina na CIM (4 µg/mL), leveduras murchas com cápsula rugosa (B, D e F)

As células de *Candida* sp. no grupo de controle tinham geralmente paredes lisas, formas esféricas e apresentavam um perfil de brotamento normal. As espécies tratadas com punicalagina em CIM de 4 µg/mL apresentaram alterações estruturais e morfológicas quando comparadas ao grupo controle. Foi observada uma redução do número de células e de blastoconídios, com superfícies rugosas quando na presença de punicalagina (Figuras 12 B, D e F e 13 B, D e F).

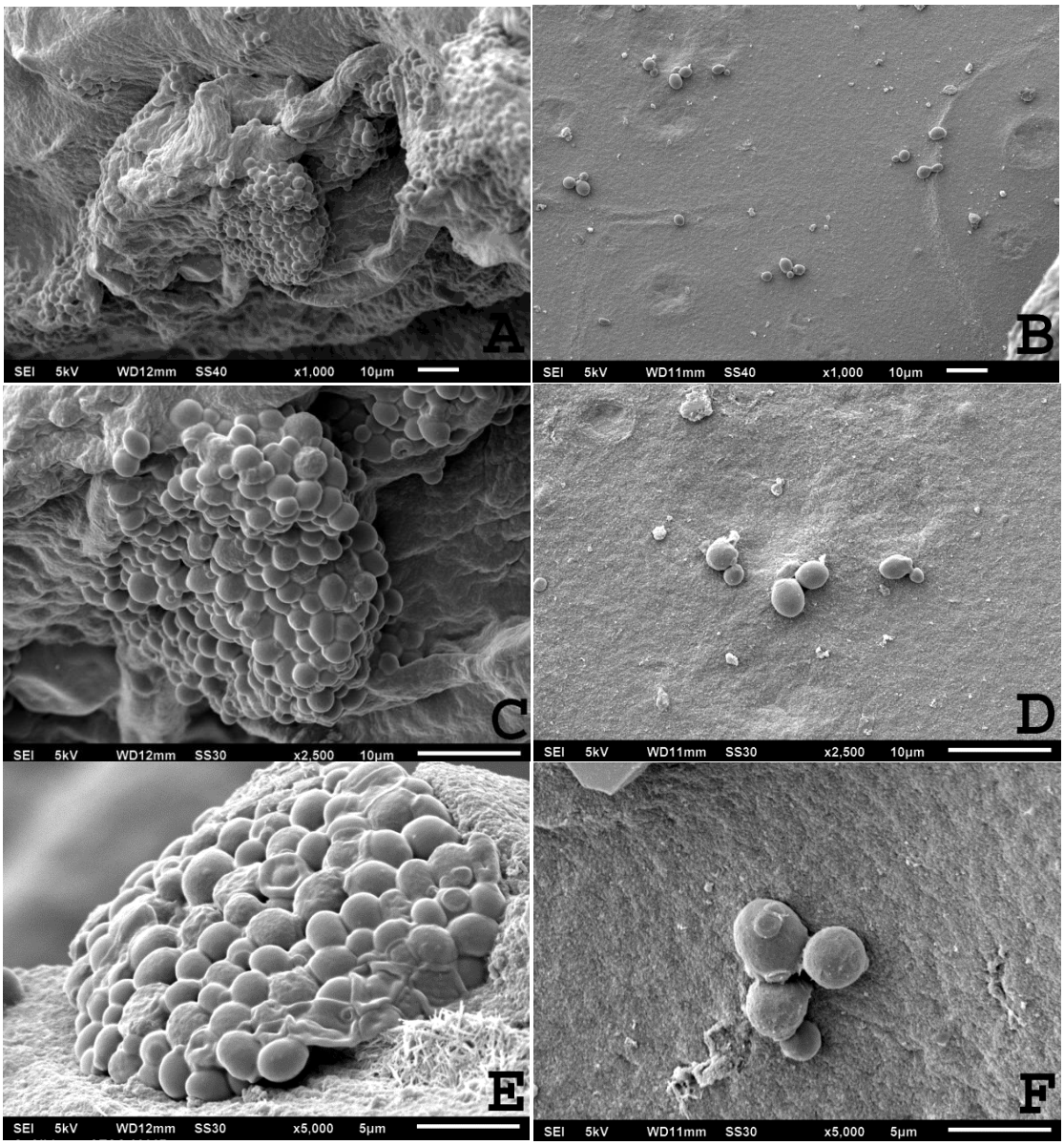

Figura 12 - Análise da morfologia celular de *C. albicans* ATCC 90028. As células sem tratamento ovoides, íntegras e com superfície lisa (A, C e E) e tratadas com punicalagina com uma CIM de 4 µg/mL, com redução do número de células e de blastoconídios (B, D e F)

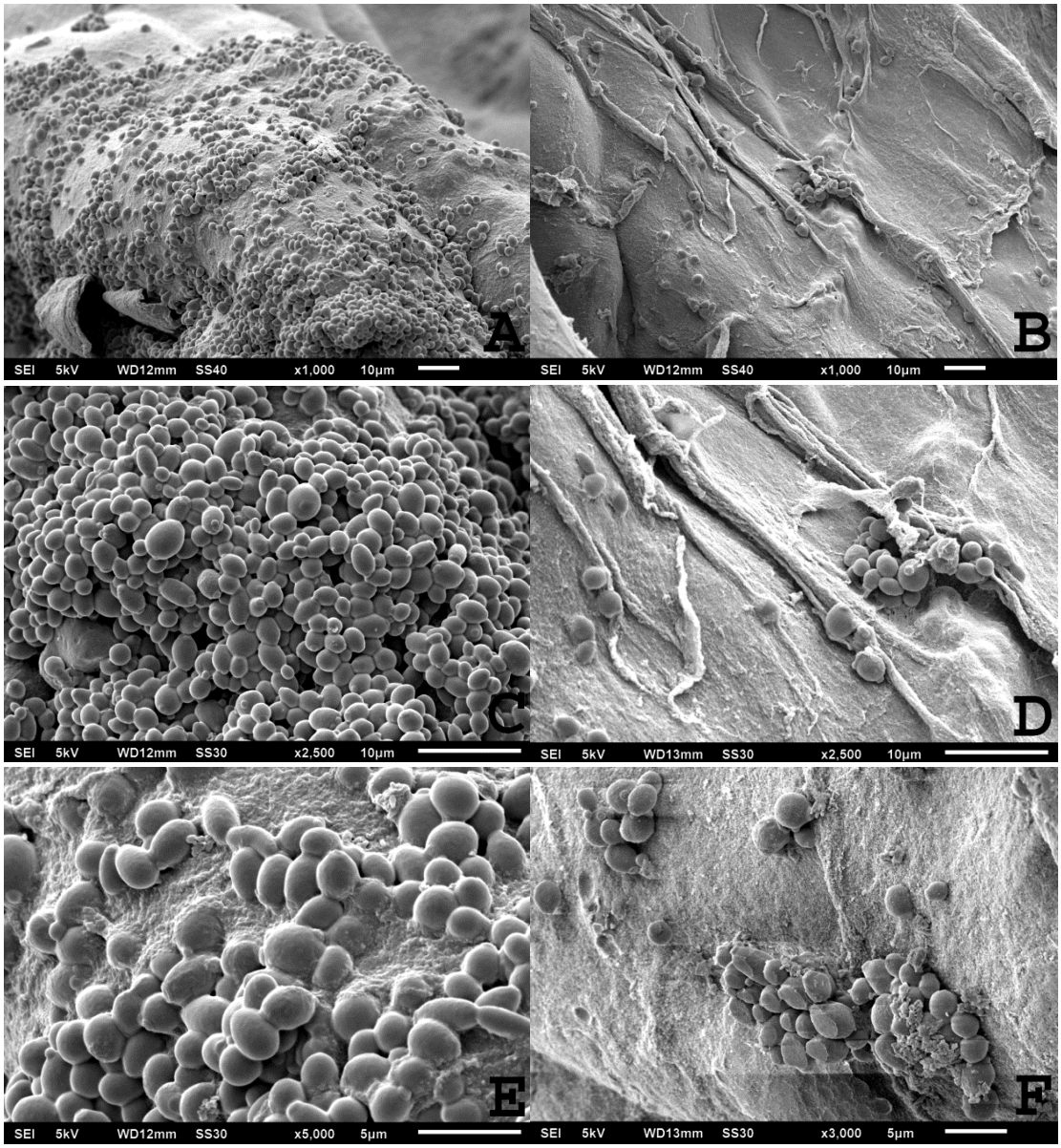

Figura 13 - Análise da morfologia celular de *C. parapsilosis* ATCC 22019. As células sem tratamento ovoides, íntegras e com superfície lisa (A, C e E) e tratadas com punicalagina com uma CIM de 4 µg/mL, com redução do número de células e de blastoconídios (B, D e F)

5.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão

O efeito da punicalagina na ultraestrutura de leveduras revelou que as células não tratadas no grupo controle tinham membrana plasmática normal e intacta que estavam próximas da parede celular, estrutura do núcleo, citoplasma e parede celular intacta (Figura 14 e 15). As células tratadas de *C. neoformans* ATCC 28957 e *C. gatti* ATCC 24065 mostraram desorganização do conteúdo citoplasmático e perda completa da forma celular normal (Figura 14 B, D e F e 15 B, D e F).

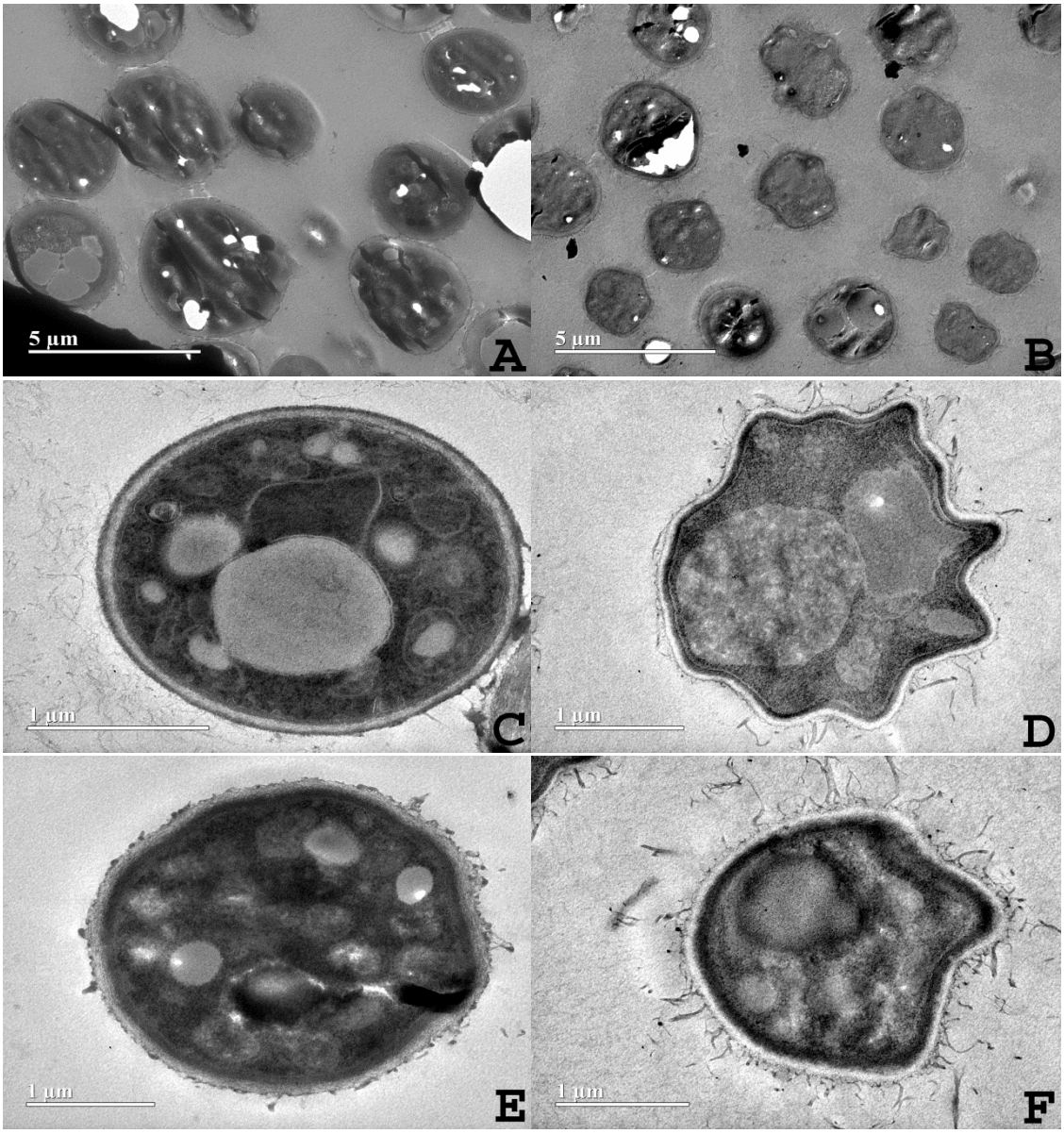

Figura 14 - Microscopia eletrônica de transmissão das células de *C.neoformans* ATCC 28957; controle sem tratamento (A, C e E); tratamento com punicalagina (B, D e F)

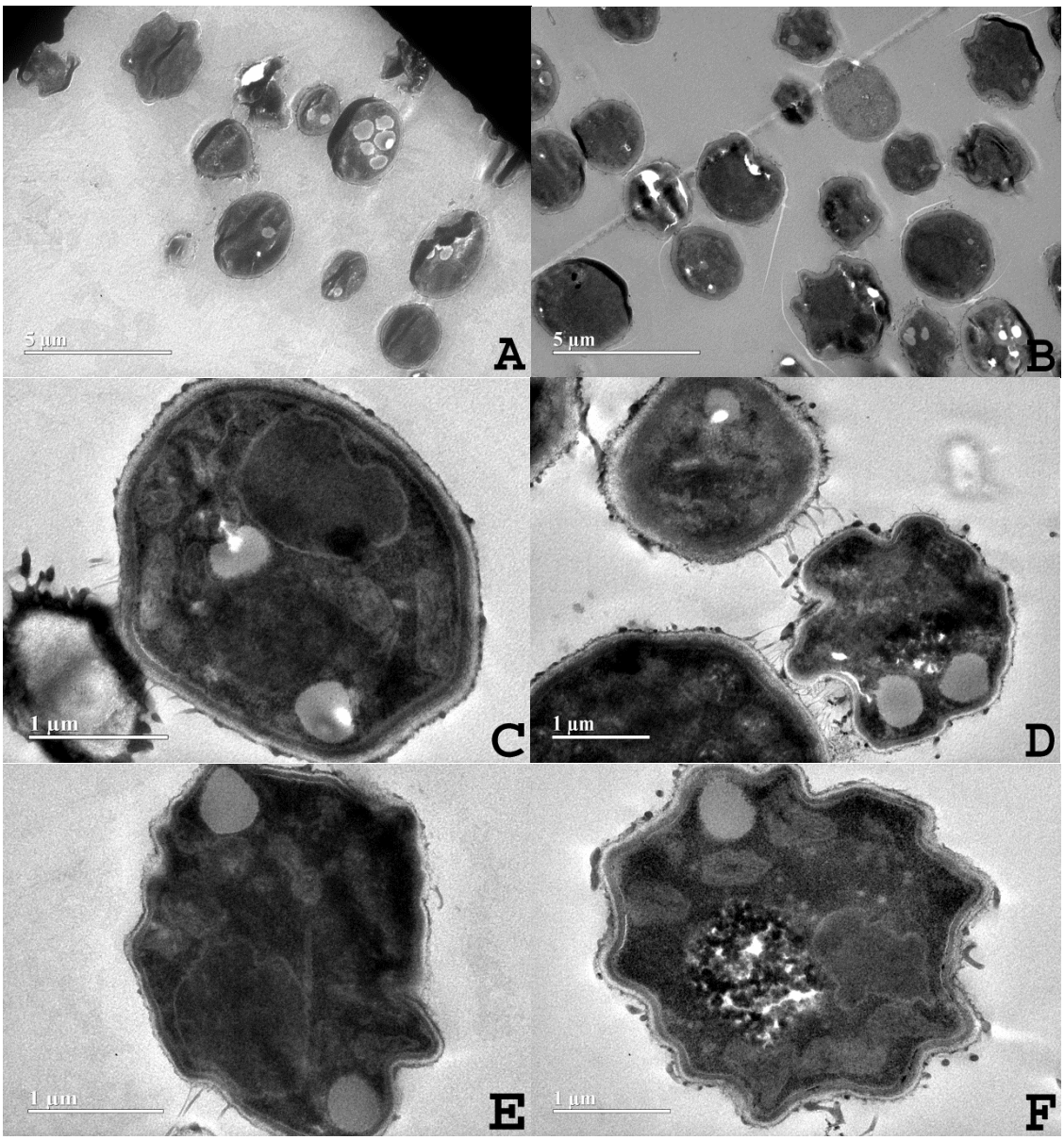

Figura 15 - Microscopia eletrônica de transmissão das células de *C.gattii* ATCC 24065; controle sem tratamento (A, C e E); tratamento com punicalagina (B, D e F)

As espécies de leveduras de *C. albicans* ATCC 90028 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 mostraram células com parede celular espessada, alterações no espaço entre a parede celular e a membrana plasmática, aumento do número e tamanho dos vacúolos, e desorganização do conteúdo citoplasmático (Figuras 16 B, D e F e 17 B, D e F).

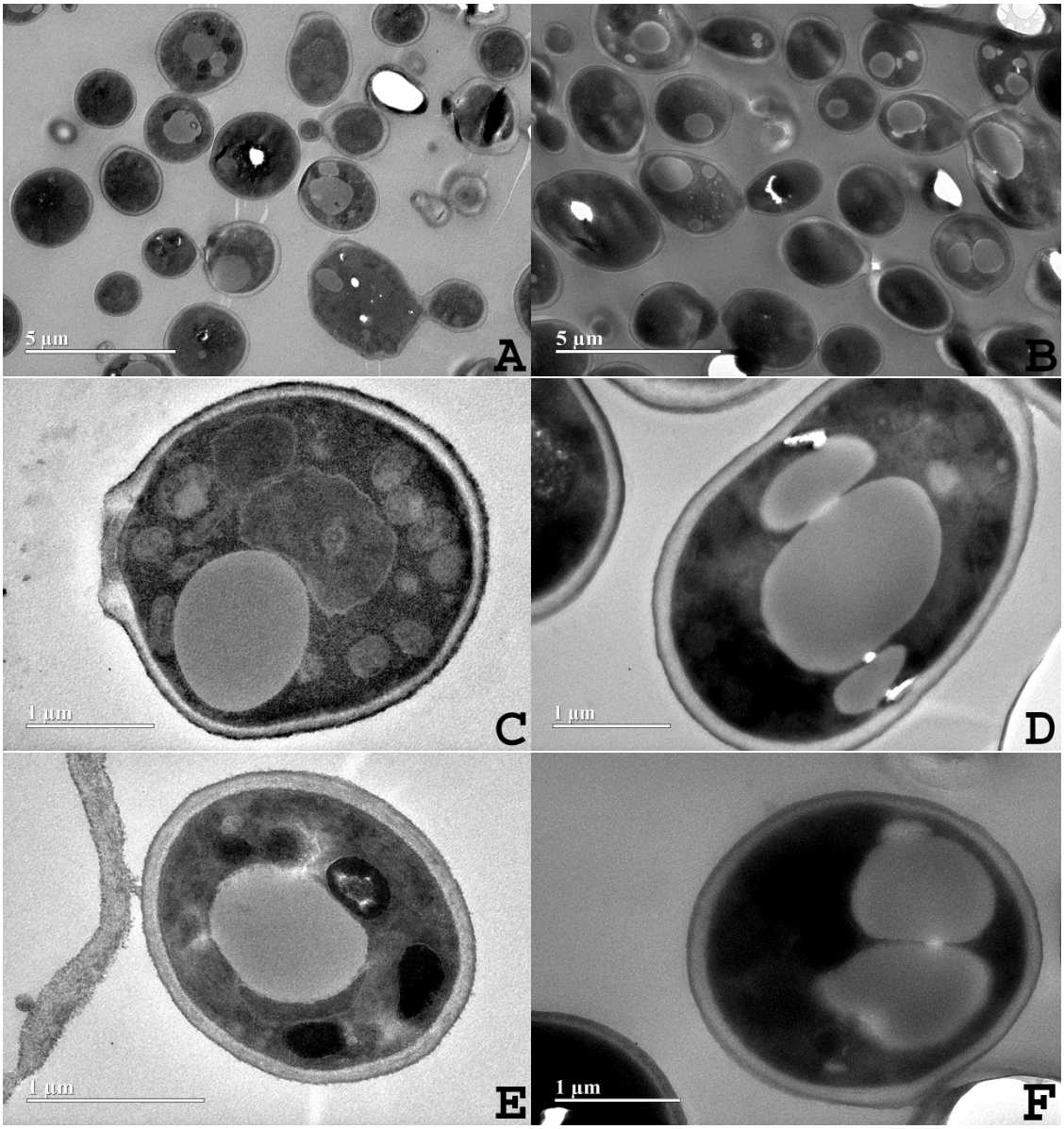

Figura 16 - Microscopia eletrônica de transmissão das células de *C. albicans* ATCC 90028; controle sem tratamento (A, C e E); tratamento com punicalagina (B, D e F)

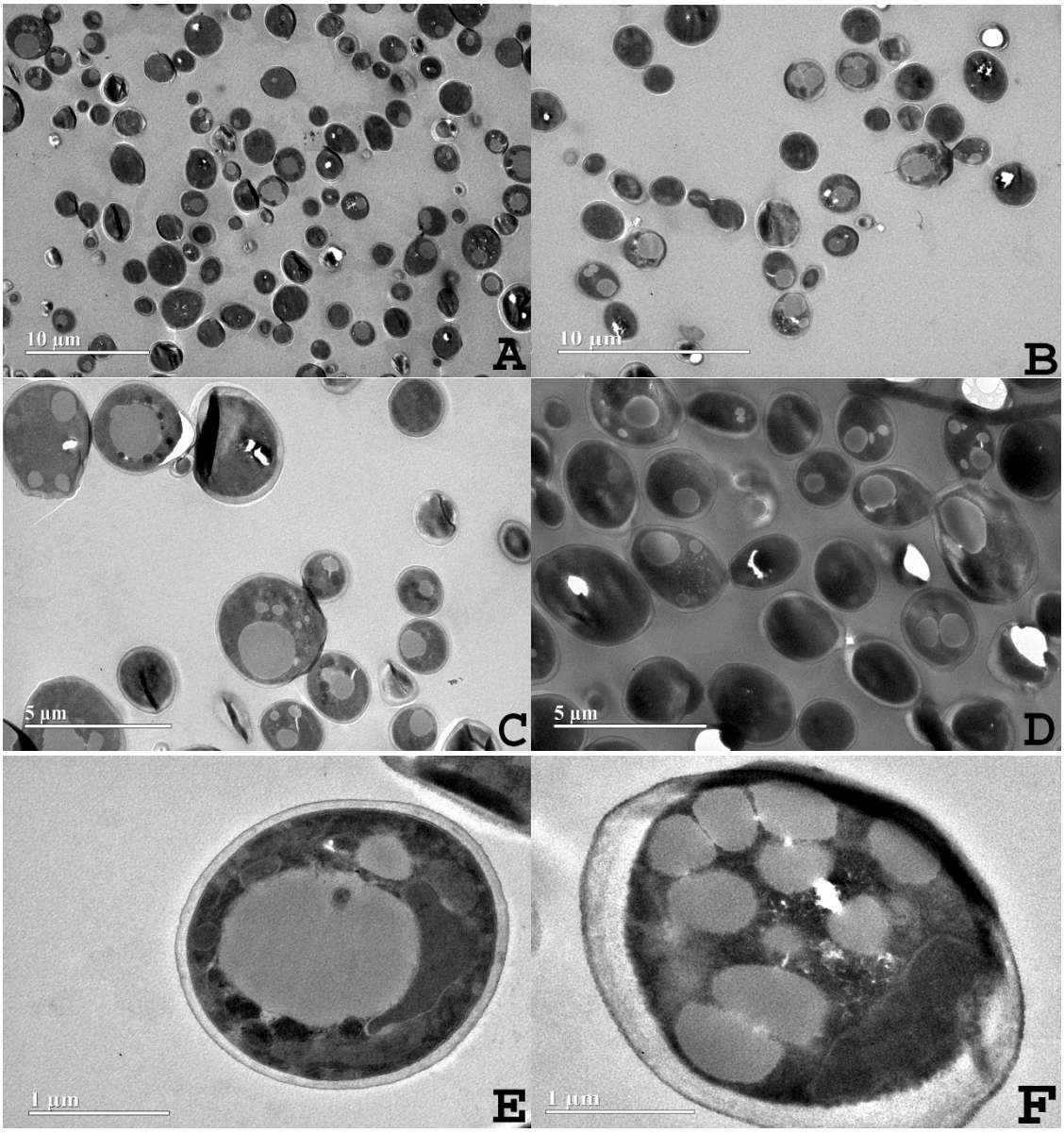

Figura 17 - Microscopia eletrônica de transmissão das células de *C. parapsilosis* ATCC 22019; controle sem tratamento (A, C e E); tratamento com punicalagina (B, D e F)

5.5 ANÁLISE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

5.5.1 Avaliação do ciclo celular

As fases do ciclo celular analisadas na presença de punicalagina revelaram dois picos, o primeiro corresponde à fase G0/G1 do ciclo celular (crescimento e formação de blastoconídios) o segundo pico corresponde à fase G2/M (divisão celular). Além disso, no histograma pode ser visualizada a fase S, que corresponde à área entre os dois picos (Figura 18). O pico G0/G1 foi significativamente maior na análise de células de *C. gattii* ATCC 24065 e de *C. albicans* 90028 tratadas com punicalagina 4x CIM

(16µg/mL) e anfotericina B (2µg/mL) comparadas com as células do controle (fungo e meio de cultura) (p<0,001). A proporção de redução de células fúngicas tratadas com punicalagina (4x CIM) e com anfotericina B (2µg/mL) para as células de *C. gattii* 24065 e para *C. albicans* ATCC 90028 na fase G2/M foi significativamente menor do que o percentual de células do controle (p<0,05). O gráfico resultante da análise do histograma encontra-se na Figura 19.

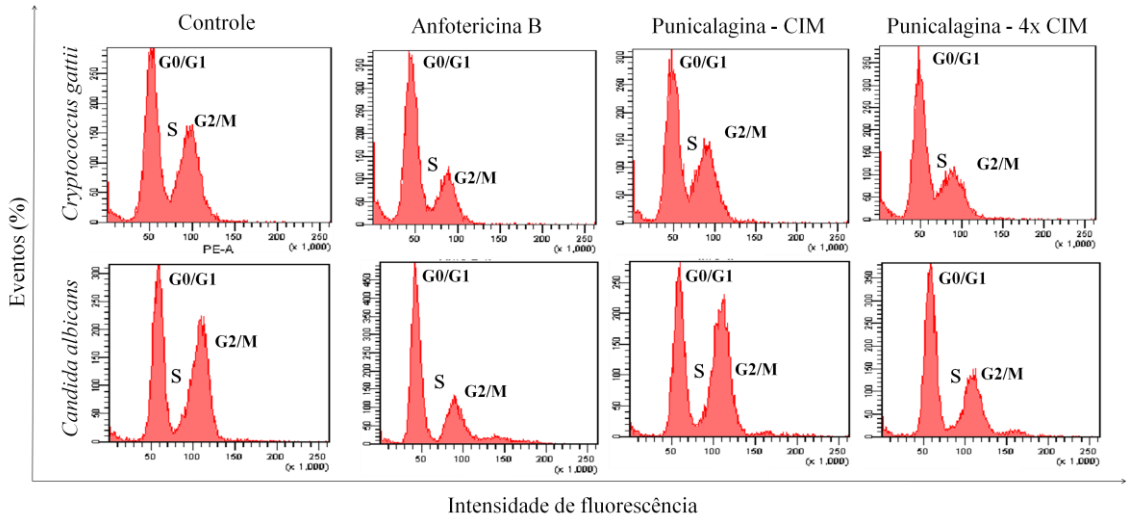

Figura 18 - Histograma de análise da população celular de *C. gattii* ATCC 24065 e *C. albicans* ATCC 90028 por citometria de fluxo

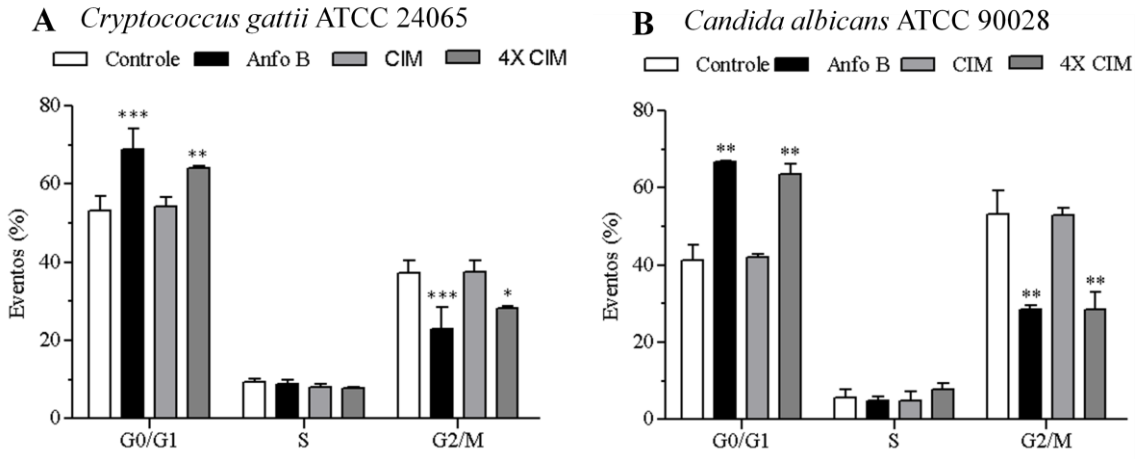

Figura 19 - Análise do ciclo celular de *C. gattii* ATCC 24065 (A) e *C. albicans* ATCC 90028 (B) sem tratamento e tratados com punicalagina e anfotericina B durante 2 horas

Nota: *p<0,05; **p<0,001; ***p<0,0001 vs. controle.

5.5.2 Avaliação da permeabilidade da membrana celular

Quanto à capacidade de lesionar a membrana plasmática fúngica, a avaliação realizada por citometria usando o corante fluorescente IP, mostrou que a punicalagina

não foi capaz de provocar lesão na membrana em concentrações correspondentes a CIM e 4X CIM (Figura 20). O resultado da avaliação de lesão de membranas em células de *C. gattii* ATCC 24065 e de *C. albicans* ATCC 90028 tratadas com o composto foi semelhante nos dois gêneros (Figura 21). Esse resultado sugere que a punicalagina não afeta a permeabilidade da membrana celular.

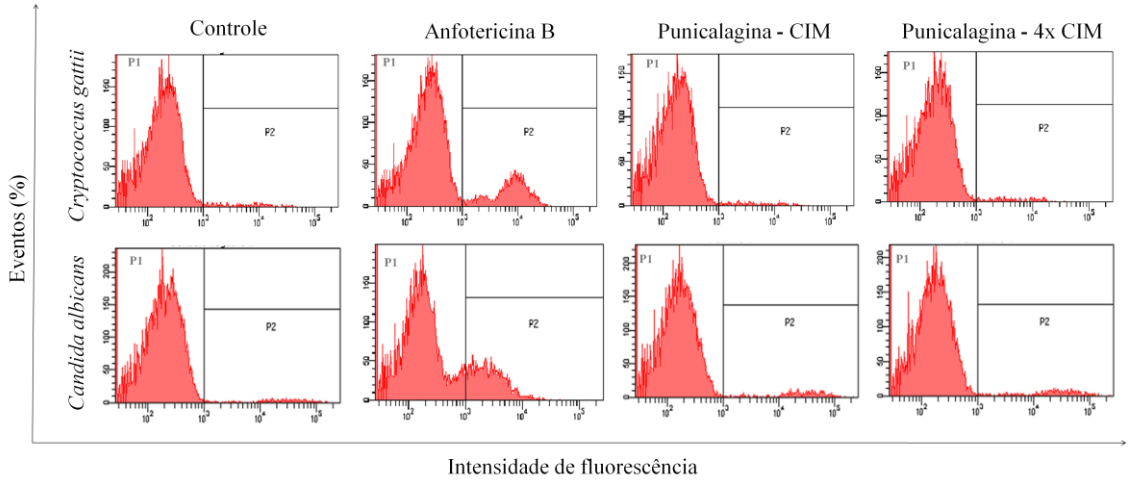

Figura 20 - Histogramas mostrando fluorescência das células sem tratamento e das tratadas com punicalagina, indicando número de morte celular pela penetração de iodeto de propídio (IP) no meio intracelular de *C. gattii* ATCC 24065 de *C. albicans* ATCC 90028

Nota: Os *Gates* P1 e P2 representam respectivamente células viáveis e não viáveis (marcadas com IP).

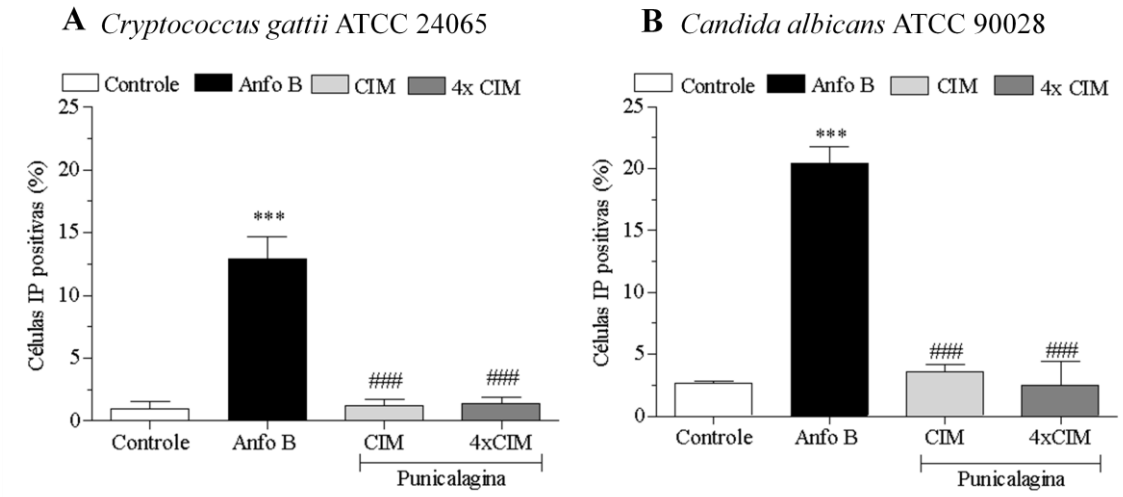

Figura 21 - Permeabilidade da membrana celular pela penetração de iodeto de propídio (IP) em *C. gattii* ATCC 24065 (A) e *C. albicans* ATCC 90028 (B), após o tratamento com anfotericina B e punicalagina por 2 horas

Nota: $^{***}p<0,0001$ vs. controle; $^{\#\#\#}p<0,0001$ vs. anfotericina B.

5.5.3 Avaliação do estresse oxidativo pela geração de espécies reativas de oxigênio (ERO)

As células expostas a punicalagina não induziram a um aumento significativo na produção de ERO quando comparadas ao controle. Por outro lado, entre as amostras tratadas com anfotericina B houve um número significativo de células ($p<0,0001$) que apresentaram um acúmulo de radicais livres. A produção de ERO nas células de *C. gattii* ATCC 24065 ($p<0,001$) e de *C. albicans* ATTC 90028 ($p<0,0001$) tratadas com punicalagina foi significativamente menor do que a produção de ERO apresentada pelas células tratadas com anfotericina B. Os resultados mostraram que mesmo em concentrações de 4x CIM de punicalagina e em tempo de 24 horas, as células fúngicas na presença deste composto não induziram maior produção de ERO do que o controle (células fúngicas e meio de cultura-RPMI) como mostrado na Figura 22.

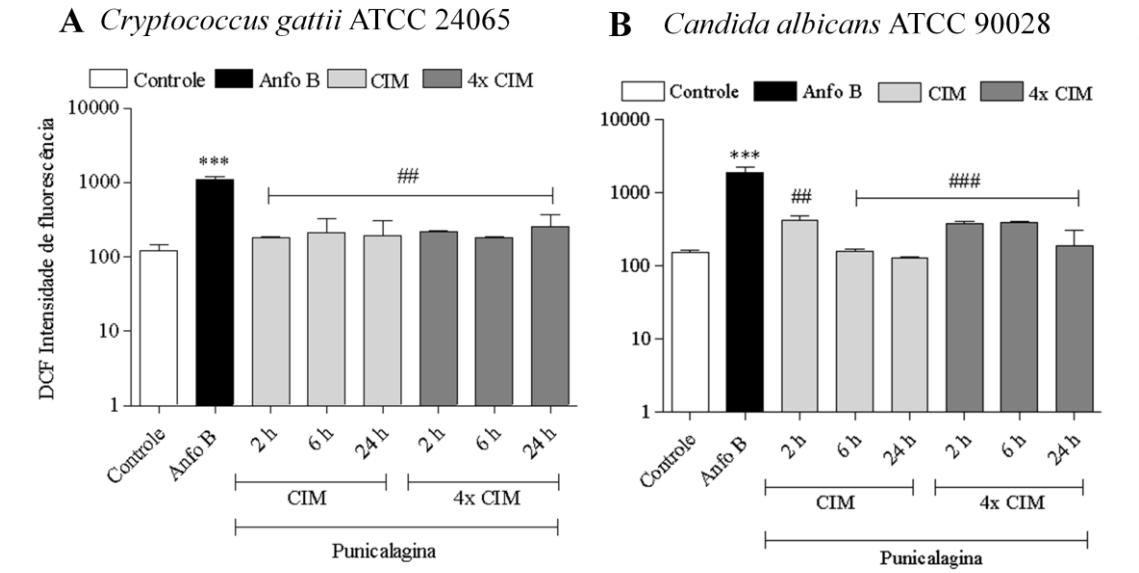

Figura 22 - Efeito da punicalagina sobre a inibição da produção de espécies reativas de oxigênio em células de *C. gattii* ATCC 24065 (A) e *C. albicans* ATCC 90028 (B), após o tratamento com anfotericina B (2 µg/mL) e punicalagina (4 µg/mL e 16 µg/mL). As células foram incubadas durante 2, 6 e 24 horas a temperatura de 37 °C

Nota: $^{***}p<0,0001$ vs. controle; $^{###}p<0,0001$ e $^{##}p<0,001$ vs. anfotericina B.

5.5.4 Avaliação da perda de potencial da membrana (ΔΨm)

As células de *C. gattii* ATCC 24065 e de *C. albicans* ATCC 90028 não apresentaram perda significativa do potencial de membrana mitocondrial em relação ao controle. As células de *C. gattii* ATCC 24065 tratadas com punicalagina na

concentração correspondente a 4x CIM (16 µg/mL) não apresentaram mudança no potencial de membrana mitocondrial, enquanto as células de *C. albicans* ATCC 90028 tratadas com punicalagina nesta concentração (4x CIM) foram induzidas a uma redução significativa de potencial da membrana mitocondrial em relação ao controle ($p<0,05$).

As células tratadas com anfotericina B (2 µg/mL) comparadas ao controle apresentaram redução significativa do potencial de membrana mitocondrial ($p<0,0001$) (Figura 23).

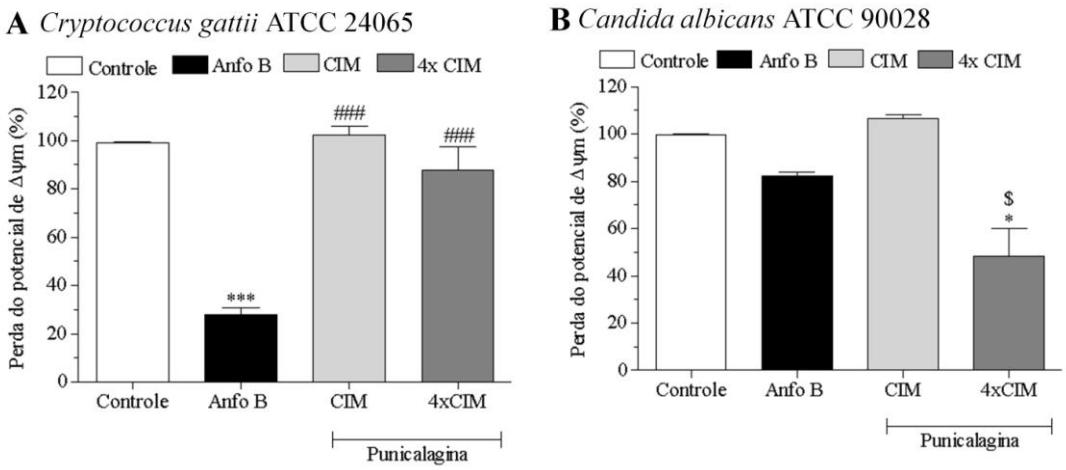

Figura 23 - Perda do potencial de membrana mitocondrial, analisada pela adição de rodamina 123, nas células de *C. gattii* ATCC 24065 (A) e *C. albicans* ATCC 90028 (B) tratadas com anfotericina B (2 µg/mL) e punicalagina na CIM (4 µg/mL) e 4x CIM (16 µg/mL)

Nota: $^{*}p<0,05$; $^{***}p<0,0001$ vs. controle; $^{###}p<0,0001$ vs. anfotericina B; $^{\$}p<0,05$ vs. CIM.

5.6 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

5.6.1 Potencial de citotoxicidade em células Balb/c 3T3

O efeito das diferentes concentrações de punicalagina nas células de fibroblastos da linhagem Balb-c 3T3 após exposição por um período de 48 horas é mostrado na Figura 24. A metodologia usando a incorporação de vermelho neutro nas células de fibroblastos mostrou que a concentração de punicalagina que causa a morte de 50% destas células, definida como índice de citotoxicidade (IC_{50}) foi de 58,7 µg/mL. Não foi possível determinar o IC_{50} das células tratadas com anfotericina B, uma vez que a menor concentração testada promoveu uma viabilidade de cerca de 10%. Isso evidencia a maior citotoxicidade da anfotericina B em células 3T3, quando comparada com punicalagina (Figura 24).

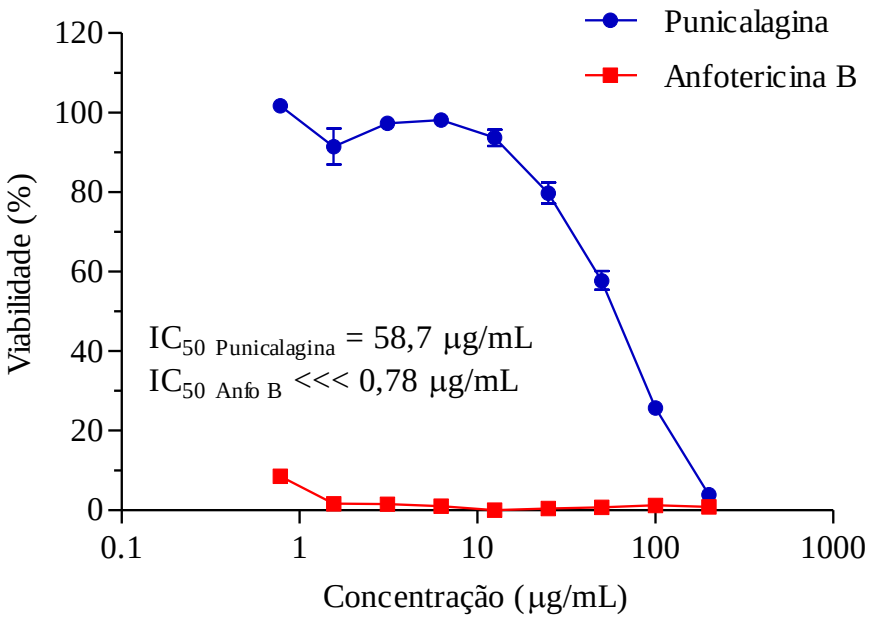

Figura 24 - Curva da viabilidade celular de fibroblastos da linhagem Balb-c 3T3 após exposição por um período de 48 horas em diferentes concentrações de punicalagina, pela incorporação do vermelho neutro (IC_{50}=58,7 µg/mL)

A observação macroscópica das placas de microtitulação, após o tratamento com punicalagina ou anfotericina B das células de fibroblastos Balb/c 3T3, mostrou maior absorção do vermelho neutro em concentrações maiores quando comparadas com as menores concentrações de punicalagina ou de anfotericina B como evidenciada na Figura 20.

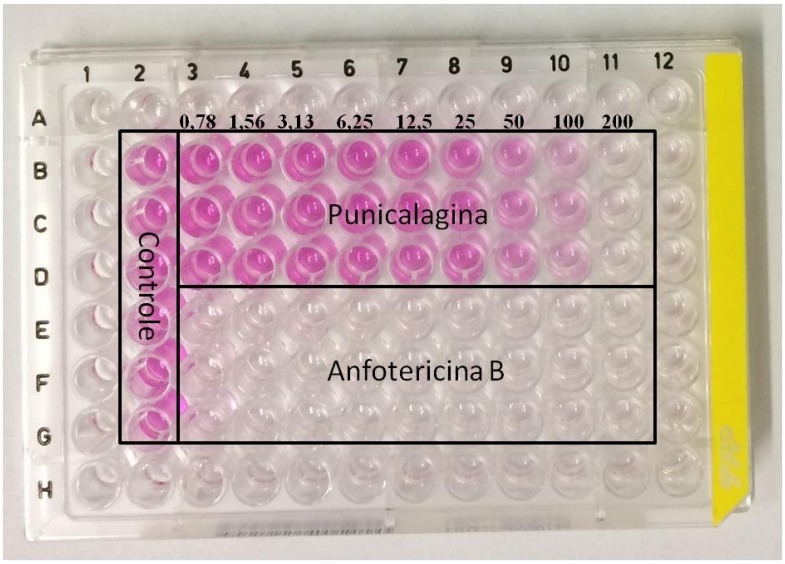

Figura 25 - Absorção do corante vermelho neutro por células 3T3 tratadas com diferentes concentrações de punicalagina e de anfotericina B

5.6.2 Avaliação do potencial de citotoxicidade em células A549

O efeito das diferentes concentrações de punicalagina nas células de carcinoma pulmonar humano A549 após exposição por um período de 48 horas é mostrado na Figura 26. A metodologia usando a incorporação de MTT nas células A549 mostrou que a concentração de punicalagina que causa a morte de 50% destas células, definida como índice de citotoxicidade (IC 50%) foi >200 µg/mL, enquanto para anfotericina B, usada como controle de citotoxicidade o IC foi = 59,6 µg/mL.

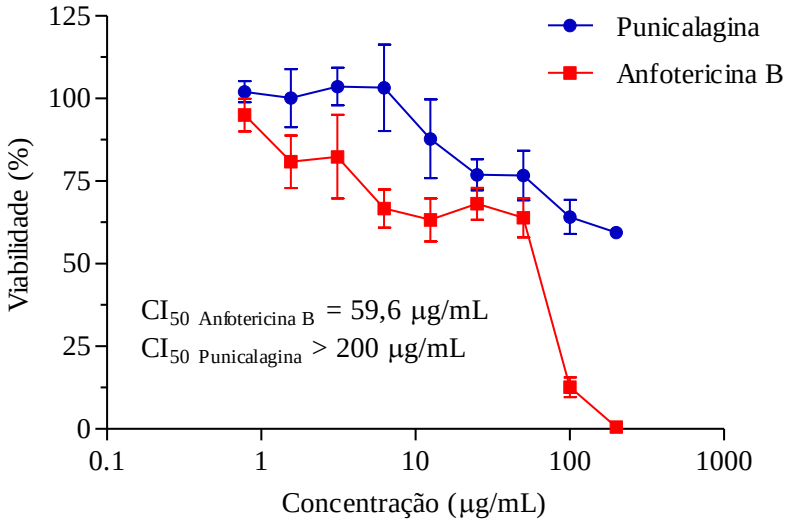

Figura 26 - Curva da viabilidade de células de carcinoma pulmonar humano A549 após exposição por um período de 45 horas de diferentes concentrações de punicalagina (IC_{50}= >200 µg/mL)

5.6.3 Ensaio hemolítico

Os resultados de citotoxicidade em eritrócitos de carneiro quando expostos a punicalagina mostraram que concentrações >256 µg/mL foram capazes de produzir hemólise destas células, enquanto para anfotericina B a concentração de 8 µg/mL mostrou hemólise das células de eritrócitos. A concentração de 256 µg/mL representa mais de 60 vezes a CIM de punicalagina para as células fúngicas.

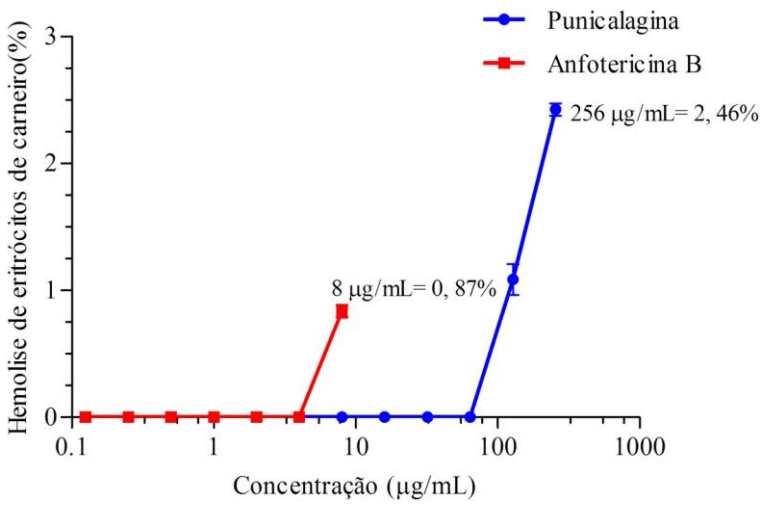

Figura 27 - Hemólise de eritrócitos de carneiro (porcentagem) na presença de punicalagina e anfotericina B em diferentes concentrações

6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, vários agentes antifúngicos foram introduzidos para profilaxia e tratamento de espécies do complexo *Cryptococcus neoformans* e de *Candida* (PIANALTO; ALSPAUGH, 2016). Os tratamentos farmacológicos atuais são eficazes, mas espécies intrinsecamente resistentes estão emergindo rapidamente. Além da resistência dos fungos, o alto custo do tratamento e citotoxicidade dos fármacos ao hospedeiro fazem com que se busquem novos compostos antimicrobianos.

Não há consenso sobre a concentração aceitável que represente uma atividade antimicrobiana para extratos, frações ou compostos extraídos de plantas (MESA-ARANGO et al., 2009). De acordo com Holetz et al. (2002), os valores de CIM para extratos e frações de plantas ≤100 μg/mL são classificados como boa inibição, de 100 a 500 μg/mL como inibição moderada, de 500 a 1000 μg/mL como atividade fraca e, mais do que 1000 μg/mL são classificados como inativos. Uma análise pontual demonstrou potencial atividade inibidora de punicalagina contra espécies de *Candida* e contra espécies do complexo *C. neoformans*, pois uma concentração de CIM variou de 0,5 a 4,0 μg / mL para estes isolados.

A atividade antifúngica da punicalagina foi estudada contra algumas espécies de *Candida* e contra *C. neoformans* (REDDY et al., 2007; LIU et al., 2009; ANIBAL et al., 2013), mas não há relatos descritos na literatura para *C. guilliermondii* e *C. gattii*. Alguns isolados, como *C. gattii* L20 e *C. guilliermondii* 97, apresentaram altos valores de CIM para o fluconazol, com baixos valores de CIM para a punicalagina. O fluconazol é o fármaco de escolha para o tratamento de infecções fúngicas, como a candidíase invasiva. Embora os azólicos tenham sido usados para tratar infecções por *Candida* sp., numerosos relatos de falhas de tratamento são descritos na literatura (CHEN et al., 2015; SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLÖRL, 2015; ROSSI et al., 2016; SANGLARD, 2016).

Nossos resultados demonstraram que a punicalagina possui efeito fungistático. Embora a punicalagina tenha reduzido o número de colônias, essa diferença não foi estatisticamente significante. Similarmente, Endo et al. (2010), demonstraram uma pequena redução de UFC/mL na presença de punicalagina. Da mesma forma, com resultados semelhantes, o efeito fungistático dos taninos contra leveduras foi relatado por Baba-moussa; Akpagana; Bouchet et al. (1999) e Morey et al. (2016).

Identificar e validar alvos moleculares representam o primeiro passo para a descoberta de novos medicamentos. Com o crescente desenvolvimento tecnológico, tornou-se possível identificar enzimas chaves, receptores e bloqueadores da ação dos alvos de ação na célula fúngica (KITCHEN et al., 2004). O mecanismo de ação primário dos antifúngicos azólicos ocorre pela inibição da enzima 14-alfa demetilase lanosterol, interrompendo a síntese de ergosterol da membrana (KELLY et al., 1995). Segundo vários pesquisadores, produtos extraídos de plantas podem causar uma redução considerável na quantidade de ergosterol (TIAN et al., 2012; REIS et al., 2016; ZORIĆ et al., 2016).

Nesse trabalho a punicalagina inibiu a síntese de ergosterol da membrana citoplasmática de *C. gattii* e *C. albicans*. Resultados semelhantes foram relatados por Zorick et al (2016) que demonstraram que o composto fenólico, oleuropeína, na maior concentração estudada (1,25 mg/mL), causou uma redução de 28% no teor total de esterol da membrana de *C. albicans*. Este trabalho constitui a primeira tentativa de desvendar o possível mecanismo de ação da punicalagina, avaliando seu efeito sobre a biossíntese de esterois.

Espécies de *Candida* tratadas com punicalagina apresentaram alterações morfológicas semelhantes às observadas por Endo et al. (2010) e Anibal et al. (2013). O número reduzido de células e blastoconídios, com superfícies rugosas, indicou que o composto causou sérios danos à estrutura celular. Da mesma forma, as espécies do complexo *C. neoformans* tratadas com punicalagina apresentaram alterações morfológicas, com células murchas e irregulares, causando danos na sua estrutura celular. Essas alterações representam o primeiro passo para a descoberta de novos medicamentos. Os compostos que inibem o crescimento fúngico e causam alterações morfológicas podem ser sugeridos como potenciais agentes antifúngicos.

Há poucos relatos do efeito ultraestrutural da punicalagina em células fúngicas. Os dados obtidos por microscopia eletrônica de transmissão mostraram que as leveduras sofreram alterações morfológicas quando tratadas com punicalagina. Similar aos resultados encontrados no nosso trabalho Endo et al. (2010) e Anibal et al. (2013) verificaram alterações na parede celular, vacúolos de tamanho aumentado, além, desorganização no conteúdo citoplasmático.

A análise celular por citometria de fluxo possibilita o conhecimento do possível mecanismo de ação de cada antifúngico como interferência no ciclo celular, lesão de membrana plasmática do fungo ou ainda alterações mitocondriais sob a ação do

composto. Como possível mecanismo de ação visualizamos que a punicalagina inibe o desenvolvimento do fungo por sua atuação no ciclo celular. Esse é o primeiro trabalho que evidencia o mecanismo de ação da punicalagina usando esta metodologia.

A concentração de punicalagina que causou 50% de citotoxicidade (IC50) nas células Balb/c 3T3 de 58,7 μg/mL, 14,6 vezes maior do que a CIM (4 μg/mL) e IC50 de 200 μg/mL com células de carcinoma A549, portanto, 50 vezes maior do que a CIM confirmam baixa toxicidade *in vitro* observada para a punicalagina. Vários pesquisadores usaram diferentes tipos de linhagens celulares para realizar estudos *in vitro* usando punicalagina. Endo et al. (2010) em células Vero e macrófagos J774G8, Foss et al. (2014) em células Vero e Seidi et al. (2016) em células de carcinoma ovariano humano (SKOV3), de adenocarcinoma de mama (MCF-7), células de câncer de pulmão (A549) e adenocarcinoma prostático humano (PC-3) verificaram baixa atividade citotóxica da punicalagina.

Também demonstramos que a punicalagina apresentou baixa toxicidade em células de eritrócitos de carneiro. A lise de células de eritrócitos de carneiro é facilmente obtida medindo-se a liberação de hemoglobina, produzindo uma boa ferramenta para estudos de toxicidade. A determinação da atividade de hemólise é rápida, reprodutível e barata (MAPFUNDE; SITHOLE; MUKANGANYAMA, 2016).

A punicalagina possui potencial antifúngico contra importantes leveduras patogênicas e apresenta baixo perfil de citotoxicidade para células animais. O desempenho da punicalagina faz com que esse composto seja promissor para o tratamento das infecções fúngicas causadas por leveduras.

7 CONCLUSÕES

- Punicalagina inibe o crescimento das leveduras pertencentes aos gêneros *Candida* e *Cryptococcus neoformans* em concentrações ≤4µg/mL, mostrando se com potencial antifúngico.
- Os elevados valores de concentração fungicida mínima, associados aos resultados mostrados na cinética de crescimento das leveduras mostram que possivelmente a punicalagina tenha efeito fungistático, ou seja, apenas inibe o crescimento das células fúngicas.
- A intensa redução de ergosterol das células fúngicas verificada sob a ação de punicalagina sugere que este composto atua da mesma forma que os derivados azólicos, ou seja, pela inibição de síntese da membrana citoplasmática.
- A análise morfológica e ultraestrutural mostrou que a punicalagina torna a célula rugosa e causa uma intensa desorganização intracelular, o que também sugere um possível mecanismo de ação.
- O principal mecanismo de ação da punicalagina é provavelmente a capacidade de atuar na alteração do ciclo celular: fases G0/G1 e fases G2/M, comprometendo a divisão celular.
- Com relação à citotoxicidade da punicalagina sobre as células de fibroblastos de camundongos Balb/c 3T3, células alveolares A549 e eritrócitos de carneiro, valores maiores que os observados no teste de suscetibilidade foram observados para esse composto. As concentrações encontradas sugerem que este composto apresenta baixa toxicidade para as células de animais, indicando a viabilidade de seu uso no tratamento de infecções por espécies do complexo *C. neoformans* e *Candida*.
- Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que a punicalagina apresenta-se como um potencial agente antifúngico para o tratamento de importantes leveduras patogênicas.

REFERÊNCIAS

AGURI, T. T.; ANAKA, T. T.; OUNO, I. K. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne Disease. v. 27, n. December, 2004.

AHMAD, A.; KHAN, A.; AKHTAR, F.; YOUSUF, S.; XESS, I.; KHAN, L. A.; MANZOOR, N. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 30, n. 1, p. 41–50, 2011.

AL-MAMUN, M. A.; HUSNA, J.; KHATUN, M.; HASAN, R.; KAMRUZZAMAN, M.; HOQUE, K. M. F.; REZA, M. A.; FERDOUSI, Z. Assessment of antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of two vegetable species of *Amaranthus* in Bangladesh. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 157, 2016. Disponível em: <http://bmccomplementalternmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-016-1130-0>.

ALBERTSON, G. D.; NIIMI, M.; CANNON, R. D.; JENKINSON, H. F. Multiple efflux mechanisms are involved in *Candida albicans* fluconazole resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 40, n. 12, p. 2835–2841, 1996.

ALMYROUDIS, N. G.; SUTTON, D. A.; FOTHERGIL, A. W.; RINALDI, M. G.; KUSNE, S. *In vitro* susceptibilities of 217 clinical isolates of zygomycetes to conventional and new antifungal agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 7, p. 2587–2590, 2007.

ANDRIOLE, V. T. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal therapy. **International Journal of Antimicrob agents**, v. 16, n. 3, p. 317–321, 2000.

ANIBAL, P. C.; PEIXOTO, I. T. A.; FOGLIO, M. A.; HOFLING, J. F. Antifungal activity of the ethanolic extracts of *Punica granatum* L. and evaluation of the morphological and structural modifications of its compounds upon the cells of *Candida* spp. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 44, n. 3, p. 839–848, 2013.

ARAÚJO, A. J. **Mecanismos envolvidos na indução de morte celular por desacetilnemorona em células de câncer de colorretal**. 2013. Universidade Federal do Ceará, 2013.

ARENDRUP, M. C.; BOEKHOUT, T.; AKOVA, M.; MEIS, J. F.; CORNELY, O. A.; LORTHOLARY, O.; ECMM*, study group and. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 3, p. 76–98, 2013.

ARENDRUP, M. C.; PERLIN, D. S. Echinocandin resistance: an emerging clinical problem? **Curr Opinion Infectious Diseases**, v. 27, n. 6, p. 484–492, 2014.

ARTHINGTON-SKAGGS, B. A.; JRADI, H.; DESAI, T.; MORRISON, C. J. Quantitation of ergosterol content: Novel method for determination of fluconazole

susceptibility of *Candida albicans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 10, p. 3332–3337, 1999.

ASMUNDSDÓTTIR, L. R.; ERLENDSDÓTTIR, H.; HARALDSSON, G.; GUO, H.; XU, J.; GOTTFREDSSON, M. Molecular epidemiology of candidemia: evidence of clusters of smoldering nosocomial infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, n. 2, p. e17-24, 2008.

ASSAL, F. E. El; PAULA, J. A. M.; CAPELETTI, L. S.; ABRÃO, F. Y.; ATAÍDES, F. S.; SÁ, F. A. da S.; COSTA, C. R.; FERNANDES, O. de F. L.; SOUZA, L. K. H.; SILVA, M. do R. R. *Pimenta pseudocaryophyllus* inhibits virulence factors and promotes metabolic changes in *Candida* yeast. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 5, p. 618–623, out. 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822014000500618&lng=en&tlng=en>.

BABA-MOUSSA, F.; AKPAGANA, K.; BOUCHET, P. Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 3, p. 335–338, set. 1999. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874198001846>.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191–203, 2006.

BANIHANI, S.; SWEDAN, S.; ALGURAAN, Z. Pomegranate and type 2 diabetes. **Nutrition Research**, v. 33, n. 5, p. 341–348, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2013.03.003>.

BARWICZ, J.; DUMONT, I.; OUELLET, C.; GRUDA, I. Amphotericin B toxicity as related to the formation of oxidatively modified low-density lipoproteins. **Biospectroscopy**, v. 4, p. 135–144, 1998.

BARWICZ, J.; GRUDA, I.; TANCREDE, P. A kinetic study of the oxidation e¡ects of amphotericin B on human low-density lipoproteins. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 465, p. 83–86, 2000.

BATES, D. W.; SU, L.; YU, D. T.; CHERTOW, G. M.; SEGER, D. L.; GOMES, D. R. J.; DASBACH, E. J.; PLATT, R. Mortality and costs of acute renal failure associated with Amphotericin B therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 5, p. 686–693, 2001.

BERMAN, J.; SUDBERY, P. E. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, p. 918–932, 2002.

BIELSKA, E.; MAY, R. C. What makes *Cryptococcus gattii* a pathogen? **FEMS Yeast Research**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2016.

BITAR, D.; LORTHOLARY, O.; LE STRAT, Y.; NICOLAU, J.; COIGNARD, B.; TATTEVIN, P.; CHE, D.; DROMER, F. Population-based analysis of invasive fungal

infections, France, 2001-2010. **Emerging Infectious Diseases journal**, v. 20, n. 7, p. 1149–1155, 2014.

BRAJTBURG, J.; POWDERLY, W. G.; KOBAYASHI, G. S.; MEDOFF, G. Amphotericin B : Current Understanding of Mechanisms of Actiont. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, n. 2, p. 183–188, 1990.

BRITO, P.; LINO-NETO, J.; DOLDER, H. Sperm structure and ultrastructure of the *Melittobia hawaiiensis*, Perkins and *M. australica*, Girault (*Chalcidoidea: Eulophidae*). **Tissue and Cell**, v. 41, n. 2, p. 113–117, abr. 2009.

BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; GOW, N. A.; LEVITZ, S. M.; NETEA, M. G.; WHITE, T. C. Hidden killers: human fungal infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, p. 165rv13, 2012.

BUTTS, A.; PALMER, G. E.; ROGERS, P. D.; BUTTS, A.; PALMER, G. E.; ROGERS, P. D. Antifungal adjuvants : preserving and extending the antifungal arsenal. **Virulence**, v. 5594, n. July, p. 1–33, 2016.

CALDERONE, R. A. ***Candida* and candidiasis**. Washington DC: ASM Press, 2002.

CARNEIRO, C. C.; DA COSTA SANTOS, S.; DE SOUZA LINO, R.; BARA, M. T. F.; CHAIBUB, B. A.; DE MELO REIS, P. R.; CHAVES, D. A.; DA SILVA, A. J. R.; SILVA, L. S.; DE MELO E SILVA, D.; CHEN-CHEN, L. Chemopreventive effect and angiogenic activity of punicalagin isolated from leaves of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 310, p. 1–8, nov. 2016. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X16302381>.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira** BrasiliaEmbrapa-cnpf/spi, , 1994.

CASADEVALL, A. Cryptococci at the brain gate: break and enter or use a Trojan horse? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 5, p. 1389–1392, 2010.

CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. ***Cryptococcus neoformans***. [s.l.] Washington DC: American Society of Microbiology Press, 1998.

CASADEVALL, A.; ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 354–358, 2000.

CASTANHEIRA, M.; MESSER, S. A.; JONES, R. N.; FARRELL, D. J.; PFALLER, M. A. Activity of echinocandins and triazoles against a contemporary (2012) worldwide collection of yeast and moulds collected from invasive infections. **International Journal Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 4, p. 320–326, 2014.

CDC. **Antibiotic resistance threats in the United States, 2013**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/index.html>. Acesso em: 10 abr. 2016.

CHEN, S. C.; KORMAN, T. M.; SLAVIN, M. A.; MARRIOTT, D.; BYTH, K.; BAK, N.; CURRIE, B. J.; HAJKOWICZ, K.; HEATH, C. H.; KIDD, S.; MCBRIDE, W. J. H.;

MEYER, W.; MURRAY, R. Antifungal Therapy and Management of Complications of Cryptococcosis due to *Cryptococcus gattii*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 57, n. 4, p. 543–551, 2013.

CHEN, S. C.; MEYER, W.; SORRELL, C. *Cryptococcus gattii* Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 980–1024, 2014.

CHEN, Y.-C.; CHANG, T.-Y.; LIU, J.-W.; CHEN, F.-J.; CHIEN, C.-C.; LEE, C.-H.; LU, C.-H. Increasing trend of fluconazole-non-susceptible *Cryptococcus neoformans* in patients with invasive cryptococcosis: a 12-year longitudinal study. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 277, 22 dez. 2015. Disponível em: <http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-015-1023-8>.

CLSI. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A3,** 2008. [s.l: s.n.]

CLSI. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. M27-S4**. [s.l.] Institute, 2012.

COELHO, C.; CASADEVALL, A. Cryptococcal therapies and drug targets: The old, the new and the promising. **Cellular Microbiology**, v. 18, n. April, p. 792–799, 2016.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; SUKIENIK, T.; PASQUALOTTO, A. C.; ANDREOTTI, R.; QUEIROZ-TELLES, F.; NOUER, S. A.; NUCCI, M. Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter studies sequentially conducted over a 9-year period. **Intensive Care Medicine**, v. 40, n. 10, p. 1489–1498, 2014.

CORNELY, O. A.; BASSETTI, M.; CALANDRA, T.; GARBINO, J.; KULLBERG, B. J.; LORTHOLARY, O.; MEERSSEMAN, W.; AKOVA, M.; ARENDRUP, M. C.; ARIKAN-AKDAGLI, S.; BILLE, J.; CASTAGNOLA, E.; CUENCA-ESTRELLA, M.; DONNELLY, J. P.; GROLL, A. H.; HERBRECHT, R.; WW, H.; HE, J.; C, L.-F.; G, P.; MD, R.; E, R.; PE, V.; C, V.; AJ, U.; STUDY, E. F. I. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 7, p. 19–37, 2012.

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

DA COSTA, M. P.; BOZINIS, M. C. V.; ANDRADE, W. M.; COSTA, C. R.; DA SILVA, A. L.; ALVES DE OLIVEIRA, C. M.; KATO, L.; FERNANDES, O. de F. L.; SOUZA, L. K. H.; SILVA, M. do R. R. Antifungal and cytotoxicity activities of the fresh xylem sap of *Hymenaea courbaril* L. and its major constituent fisetin. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 245, 16 dez. 2014. Disponível em: <http://bmccomplementalternmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6882-14-245>.

DE KRUIJFF, B.; DEMEL, R. . Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of Acholeplasma laidlawii cells and lecithin liposomes. III. Molecular structure of the

polyene antibiotic-cholesterol complexes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 339, n. 1, p. 57–70, 1974.

DE LOGU, A.; SADDI, M.; CARDIA, M. C.; BORGNA, R.; SANNA, C.; SADDI, B.; MACCIONI, E. *In vitro* activity of 2-cyclohexylidenhydrazo-4-phenyl-thiazole compared with those of amphotericin B and fluconazole against clinical isolates of *Candida* spp. and fluconazole-resistant *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 692–698, 2005.

DE SOUZA, A. C. M.; KATO, L.; DA SILVA, C. C.; CIDADE, A. F.; DE OLIVEIRA, C. M. A.; SILVA, M. do R. R. Antimicrobial activity of *Hymenaea martiana* towards dermatophytes and *Cryptococcus neoformans*. **Mycoses**, v. 53, n. 6, p. 500–503, nov. 2009. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0507.2009.01740.x>.

DEL RIO, D.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; SPENCER, J. P. E.; TOGNOLINI, M.; BORGES, G.; CROZIER, A. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. **Antioxidants & redox signaling**, v. 18, n. 14, p. 1818–92, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22794138%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3619154&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

DELATTIN, N.; CAMMUE, B. P. a; THEVISSEN, K. Reactive oxygen species-inducing antifungal agents and their activity against fungal biofilms. **Future medicinal chemistry**, v. 6, n. 1, p. 77–90, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24358949>.

DELL'AGLI, M.; GALLI, G. V; BULGARI, M.; BASILICO, N.; ROMEO, S.; BHATTACHARYA, D.; TARAMELLI, D.; BOSISIO, E. Ellagitannins of the fruit rind of pomegranate (*Punica granatum*) antagonize *in vitro* the host inflammatory response mechanisms involved in the onset of malaria. **Malaria journal**, v. 9, p. 208, 2010.

DENNING, D. W. Echinocandin antifungal drugs. **Lancet Infectious Diseases**, v. 362, n. 9390, p. 1142–1151, 2003.

DI STASI, L. C. Arte, Ciência e Magia. In: UNESP (Ed.). **Plantas Medicinais: Arte e Ciência.** [s.l: s.n.]p. 15–21, 1996.

DIEKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; HOLLIS, R. J.; JONES, R. N.; PFALLER, M. A. Activities of Caspofungin, Itraconazole, Posaconazole, Ravuconazole, Voriconazole, and Amphotericin B against 448 recent clinical isolates of filamentous fungi. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3623–3626, 2003.

DOI, A. M.; PIGNATARI, A. C. C.; EDMOND, M. B.; MARRA, A. R.; CAMARGO, L. F. A.; SIQUEIRA, R. A.; DA MOTA, V. P.; COLOMBO, A. L. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **PloS one**, v. 11, n. 1, p. e0146909, 2016. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgiartid=4726651&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

DONOVICK, R.; GOLD, W.; PAGANO, J. F.; STOUT, H. Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. I. *In vitro* studies. **Antibiotics Annual**, v. 3, p. 379–386, 1955.

DZIALO, M.; MIERZIAK, J.; KORZUN, U.; PREISNER, M.; SZOPA, J.; KULMA, A. The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 2, p. 1–41, 2016.

EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 11, p. 685–702, 2003.

ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. gattii. **J Clin Microbiol**, v. 28, n. 7, p. 1642–4, 1990.

EMMONS, C. W. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (Columba livia). **Am J Hyg**, v. 62, n. 3, p. 227–232, 1955.

ENDO, E. H.; GARCIA CORTEZ, D. A.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 7, p. 534–540, 2010.

ENOCH, D. A.; LUDLAM, H. A.; BROWN, N. M. Invasive fungal infections: A review of epidemiology and management options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 7, p. 809–818, 2006.

ENOCH, D. A.; YANG, H.; ALIYU, S. H.; MICALLEF, C. The Changing Epidemiology of Invasive Fungal Infections. In: **Human Fungal Pathogen Identification**. [s.l: s.n.]p. 17–65, 2017.

FAGANELLO, J.; ARRUDA, W.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. An alternative method to prepare samples of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans* for scanning electron microscopy analysis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 64, n. 3, p. 416–419, 2006.

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

FARAH, S.; ABDELRAHMAN, A.; NORTH, E.; CHAUHAN, H. Opportunities and Challenges for Natural Products as Novel Antituberculosis Agents. **Assay Drug Dev Technol**, v. 14, n. 1, 2016.

FINKELSTEIN, A.; HOLZ, R. Aqueous pores created in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. **Membranes**, v. 2, p. 377–408, 1973.

FOSS, S.; NAKAMURA, C.; UEDA-NAKAMURA, T.; CORTEZ, D.; ENDO, E.; DIAS FILHO, B. Antifungal activity of pomegranate peel extract and isolated compound punicalagin against dermatophytes. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 13, n. 1, p. 32, 2014. Disponível em: <http://www.ann-clinmicrob.com/content/13/1/32>.

FRANCISCO, A. The Flavonoids: Advances in Research Since 1986. In: **Phytochemical Analysis**. London: Harbone, 1995. p. 1–22.

GALDINO, P. M.; NASCIMENTO, M. V. M.; SAMPAIO, B. L.; FERREIRA, R. N.; PAULA, J. R.; COSTA, E. A. Antidepressant-like effect of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. ethanolic extract and fractions in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, n. 3, p. 581–585, 2009.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal Agents : mode of action , mechanisms of resistance , and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Cllinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 501–517, 1999.

GÓMEZ-LÓPEZ, A.; ZARAGOZA, O.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L.; UENCA-ESTRELLA, M. Pharmacotherapy of yeast infections. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 9, n. 16, p. 2801–2816, 2008.

GONZÁLEZ, G. M. *In vitro* activities of isavuconazole against opportunistic filamentous and dimorphic fungi. **Medical Mycology**, v. 47, n. 1, p. 71–76, 2009.

GOTTLIEB, D.; CARTER, H. E.; SLONEKER, J. H.; AMMANN, A. Protection of fungi against polyene antibiotics by sterols. **Science**, v. 128, n. 3320, p. 361, 1958.

GRECHI, J.; MARINHO-CARVALHO, M.; ZANCAN, P.; CINELLI, L. P.; GOMES, A. M. O.; RODRIGUES, M. L.; NIMRICHTER, L.; SOLA-PENNA, M. Glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* Down-regulates the Enzyme 6-Phosphofructo-1-kinase of Macrophages. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 17, p. 14820–14829, 2011.

GUANGHUI, L.; YUNFENG, X.; XIN, W.; BAIGANG, Z.; CHAO, S.; WEISONG, Z.; XIA, X. Tannin-rich fraction from Pomegranate rind damages membrane of *Listeria monocytogenes*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 11, n. 4, p. 313–319, 2014.

GUDLAUGSSON, O.; GILLESPIE, S.; LEE, K.; VANDE BERG, J.; HU, J.; MESSER, S.; L, H.; M, P.; D, D. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, n. 9, p. 1172–7, 2003.

GUIMARÃES, H. A.; NASCIMENTO, M. V. M.; TAVARES, A.; GALDINO, P. M.; PAULA, J. R. De; COSTA, E. A. Effects of ethanolic extract of leaves of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae (pacari), in pain and inflammation models. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 328–333, 2010.

HAGEN, F.; COLOM, M. F.; SWINNE, D.; TINTELNOT, K.; IATTA, R.; MONTAGNA, M. T.; TORRES-RODRIGUEZ, J. M.; COGLIATI, M.; VELEGRAKI, A.; BURGGRAAF, A.; KAMERMANS, A.; SWEERE, J. M.; MEIS, J. F.; KLAASSEN, C. H. W.; BOEKHOUT, T. Autochthonous and dormant *Cryptococcus gattii* infections in Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 10, p. 1618–1624, 2012.

HAGEN, F.; KHAYHAN, K.; THEELEN, B.; KOLECKA, A.; POLACHECK, I.; SIONOV, E.; FALK, R.; PARNMEN, S.; LUMBSCH, H. T.; BOEKHOUT, T.

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

HAMILL, R. J. Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. **Drugs**, v. 73, n. 9, p. 919–934, 2013.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis , New York.** 2. ed. New York: Dordrecht: Springer Netherlands, 1984.

HASLAM, E. **Plant polyphenols**. Cambridge: Cambridge University Press, 1989.

HE, M.; DU, M.; FAN, M.; BIAN, Z. *In vitro* activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. **Mycopathologia**, v. 163, n. 3, p. 137–143, 2007.

HEBER, D. Multitargeted therapy of cancer by ellagitannins. **Cancer Letters**, v. 269, n. 2, p. 262–268, 2008.

HECTOR, R. F. Compounds Active against Cell Walls of Medically Important Fungi. **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS**, v. 6, n. 1, p. 1–21, 1993.

HEIMARK, L.; SHIPKOVA, P.; GREENE, J.; MUNAYYER, H.; YAROSH-TOMAINE, T.; DIDOMENICO, B.; HARE, R.; PRAMANIK, B. N. Mechanism of azole antifungal activity as determined by liquid chromatographic/mass spectrometric monitoring of ergosterol biosynthesis. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 266, n. 2, p. 475–480, 1990.

HITCHCOCK, C. A.; DICKINSON, K.; BROWN, S. B.; EVANS, E. G.; ADAMS, D. J. Interaction of azole antifungal antibiotics with cytochrome P-450-dependent 14 alpha-sterol demethylase purified from *Candida albicans*. **Biochemical journal**, v. 266, n. 2, p. 475–480, 1990.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027–1031, out. 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762002000700017&lng=en&tlng=en>.

HULL, C. M.; HEITMAN, J. Genetics of *Cryptococcus neoformans*. **Annual Review of Genetics**, v. 36, p. 557–615, 2002.

IDNURM, A.; BAHN, Y. S.; NIELSEN, K.; LIN, X.; FRASER, J. A.; HEITMAN, J. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 753–764, 2005.

IRCHHAIYA, R.; KUMAR, A.; YADAV, A.; GUPTA, N.; KUMAR, S.; GUPTA, N.; KUMAR, S.; YADAV, V.; PRAKASH, A.; GURJAR, H. Metabolites in Plants and Its Classification. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 287–305, 2015.

KAO, A. S.; BRANDT, M. E.; PRUITT, W. R.; CONN, L. A.; PERKINS, B. A.; STEPHENS, D. S.; BAUGHMAN, W. S.; REINGOLD, A. L.; ROTHROCK, G. A.;

PFALLER, M. A.; PINNER, R. W.; HAJJEH, R. A. The epidemiology of candidemia in two United States Cities : results of a population-based active surveillance. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, p. 1164–1170, 1993.

KATHIRAVAN, M. K.; SALAKE, A. B.; CHOTHE, A. S.; DUDHE, P. B.; WATODE, R. P.; MUKTA, M. S.; GADHWE, S. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 19, p. 5678–5698, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2012.04.045>.

KELLY, S. L.; LAMB, D. C.; CORRAN, A. J.; BALDWIN, B. C.; KELLY, D. E. Mode of Action and Resistance to Azole Antifungals Associated with the Formation of 14α-Methylergosta-8,24(28)-dien-3β,6α-diol. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 207, n. 3, p. 910–915, fev. 1995. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X85712727>.

KELLY, S. L.; LAMB, D. C.; KELLY, D. E.; MANNING, N. J.; LOEFFLER, J.; HEBART, H.; SCHUMACHER, U.; EINSELE, H. Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol delta5,6-desaturation. **FEBS Letters**, v. 400, n. 1, p. 80–82, 1997.

KIM, G.; JEON, J.; KIM, J. K. Mycobiology isolation frequency characteristics of *Candida* Species from clinical specimens. **Mycobiology**, v. 44, n. 2, p. 99–104, 2016.

KINGSTON, D. G. I. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 3, p. 496–511, 2011.

KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 11, p. 935–949, nov. 2004. Disponível em: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrd1549>.

KLEPSER, M. E.; ERNST, E. J.; LEWIS, R. E.; ERNST, M. E.; PFALLER, M. A. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results : proposal for standardized methods. v. 42, n. 5, p. 1207–1212, 1998.

KLEPSER, M. E.; WOLFE, E. J.; JONES, R. N.; NIGHTINGALE, C. H. Antifungal Pharmacodynamic Characteristics of Fluconazole and Amphotericin B Tested against *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 6, p. 1392–1395, 1997.

KROCKENBERGER, M. B.; CANFIELD, P. J.; MALIK, R. *Cryptococcus neoformans* var. gattii in the koala (Phascolarctos cinereus): a review of 43 cases of cryptococcosis. **Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 41, n. 3, p. 225–234, 2003.

KUMAMOTO, C. A.; VINCES, M. D. Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. **Annual Review of Microbiology**, v. 59, p. 113–133, 2005.

KWON-CHUNG, K., BENNETT, J. High prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in tropical and subtropical regions. **Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A.**, v. 257, n. 2, p. 213–8, 1984.

KWON-CHUNG, K. J.; VARMA, A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 4, p. 574–587, 2006.

LACAZ, C. S.; HEINS-VACCARI, E M HERNÁNDEZ-ARRIAGADA, G. L.; MARTINS, E. L.; PREARO, C. A. L.; CORIM, S. M.; MARTINS, M. A. Primary Cutaneo cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotype B, in an immunocompetent patient. **Revista do instituto de medicina tropical de São Paulo**, v. 44, n. 4, p. 225–228, 2002.

LAGROU, K.; MAERTENS, J.; VAN EVEN, E.; DENNING, D. W. Burden of serious fungal infections in Belgium. **Mycoses**, v. 58, n. Suppl. S5, p. 1–5, out. 2015. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/myc.12389>.

LAI, C. C.; TAN, C. K.; HUANG, Y. T.; SHAO, P. L.; HSUEH, P. R. Current challenges in the management of invasive fungal infections. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 14, n. 2, p. 77–85, 2008.

LAMY-FREUND, M. T.; FERREIRA, V. F.; SCHREIER, S. Mechanism of inactivation of the polyene antibiotic amphotericin B. Evidence for radical formation in the process of autooxidation. **The Journal of antibiotics**, v. 38, n. 6, p. 753–757, 1985.

LARRIBA, G.; COQUE, J. J. R.; CIUDAD, A.; ANDALUZ, E. *Candida albicans* molecular biology reaches its maturity. **International Microbiology**, v. 3, p. 247–252, 2000.

LASS-FLÖRL, C. Triazole antifungal agents in invasive fungal infections: a comparative review. **Drugs**, v. 71, n. 18, p. 2409–2419, 2011.

LE FLOCH, A.; JOURDES, M.; TEISSEDRE, P. L. Polysaccharides and lignin from oak wood used in cooperage: composition, interest, assays: a review. **Carbohydrate Research**, v. 917, p. 94–112, 2015.

LEMOS, J. A.; COSTA, C. R.; ARAÚJO, C. R.; SOUZA, L. K. H.; SILVA, M. R. R. Susceptibility testing of *Candida albicans* isolated from oropharyngeal mucosa of HIV + patients to fluconazole, amphotericin B and caspofungin. Killing Kinetics of caspofungin and a amphotericin B against fluconazole. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 163–169, 2009.

LEMOS, J. de A.; PASSOS, X. S.; FERNANDES, O. de F. L.; PAULA, J. R. de; FERRI, P. H.; SOUZA, L. K. H. e; LEMOS, A. de A.; SILVA, M. do R. R. Antifungal activity from *Ocimum gratissimum* L. towards *Cryptococcus neoformans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 1, p. 55–58, fev. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762005000100011&lng=en&tlng=en>.

LI, R.-K.; A, M. C.; NORDOFF, N.; PASARELL, L.; MICHAEL, D. W.; MCGINNIS, W. *In vitro* activities of Voriconazole, Itraconazole, and Amphotericin B against Blastomyces dermatitidis,Coccidioides immitis, and Histoplasma capsulatum. **Antimicrobial Agents and ChemotherapyAgents and**, v. 44, n. 6, p. 1734–1736, 2000.

LI, S. S.; MODY, C. H. Cryptococcus. **Proceedings of the American Thoracic Society Journal**, v. 7, n. 3, p. 186–196, 2010.

LIM, C. S. Y.; ROSLI, R.; SEOW, H. F.; CHONG, P. P. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, p. 21–31, 2012.

LIMA, D. C. S.; SILVA, C. R.; SAMPAIO, B. L.; DE PAULA, J. R.; CHEN-CHEN, L. Antigenotoxic, and anticytotoxic activities of an ethanolic extract of *Lafoensia pacari* (Lythraceae) stem bark in bacteria and mice. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 3, p. 3887–3896, 2013.

LIMA, M. F.; XIMENES, E. C. P. A.; LUNA, J. S.; GOULART, A. E. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 300–306, 2006.

LIN, L.-T.; CHEN, T.-Y.; LIN, S.-C.; CHUNG, C.-Y.; LIN, T.-C.; WANG, G.-H.; ANDERSON, R.; LIN, C.-C.; RICHARDSON, C. D. Broad-spectrum antiviral activity of chebulagic acid and punicalagin against viruses that use glycosaminoglycans for entry. **BMC microbiology**, v. 13, n. Mv, p. 187, 2013.

LIU, J.; FARMER, J. J.; LANE, W.; FRIEDMAN, J.; WEISSMAN, I.; SCHREIBER, S. L. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. **Cell**, v. 66, n. 4, p. 807–815, 1991.

LIU, M.; KATERERE, D. R.; GRAY, A. I.; SEIDEL, V. Phytochemical and antifungal studies on *Terminalia mollis* and *Terminalia brachystemma*. **Fitoterapia**, v. 80, n. 6, p. 369–373, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2009.05.006>.

LÖFFLER, J.; KELLY, S. L.; HEBART, H.; SCHUMACHER, U.; LASS-FLÖR, C.; EINSELE, H. Molecular analysis of cyp51 from fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. **FEMS Microbiology Letters**, v. 151, n. 2, p. 263–268, 1997.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Vol. 1**. 7. ed. [s.l: s.n.], 2016.

LORTHOLARY, O.; RENAUDAT, C.; SITBON, K.; MADEC, Y.; DENOEUD-NDAM, L.; WOLFF, M.; FONTANET, A.; BRETAGNE, S.; DROMER, F.; FRENCH MYCOSIS STUDY, G. Worrisome trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002-2010). **Intensive Care Medicine**, v. 40, n. 9, p. 1303–1312, 2014.

LUO, G.; GEBREMARIAM, T.; LEE, H.; FRENCH, S. W.; WIEDERHOLD, N. P.; PATTERSON, T. F.; FILLER, S. G.; IBRAHIM, A. S. Efficacy of liposomal amphotericin B and posaconazole in intratracheal models of murine mucormycosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 7, p. 3340–3347, 2013.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quimica Nova**, v. 25, n. 3, p. 429–438, 2002.

MAHMOUD, S. S.; CROTEAU, R. B. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 8, p. 366–373, 2002.

MAPFUNDE, S.; SITHOLE, S.; MUKANGANYAMA, S. *In vitro* toxicity determination of antifungal constituents from *Combretum zeyheri*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 162, 2 dez. 2016. Disponível em: <http://bmccomplementalternmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-016-1150-9>.

MARCHETTI, O.; BILLE, J.; FLUCKIGER, U.; EGGIMANN, P.; RUEF, C.; GARBINO, J.; CALANDRA, T.; GLAUSER, M. P.; TÄUBER, M. G.; PITTET, D.; SWITZERLAND, F. I. N. of. Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 3, p. 311–320, 2004.

MARR, K. A.; CARTER, R. A.; CRIPPA, F.; WALD, A.; COREY, L. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 7, p. 909–917, 2002. Disponível em: <http://www.journals.uchicago.edu/doi/full/10.1086/339202>.

MARTINS, N.; BARROS, L.; HENRIQUES, M.; SILVA, S.; FERREIRA, I. C. F. R. Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 648–670, 2015.

MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 179–206, 2016.

MCGINNIS, M. R.; NORDOFF, N.; LI, R. K.; PASARELL, L.; WARNOCK, D. W. Sporothrix schenckii sensitivity to voriconazole, itraconazole and amphotericin B. **Medical Mycology**, v. 39, n. 4, p. 369–371, 2001.

MELETIADIS, J.; MEIS, J. F. G. M.; MOUTON, J. W.; RODRIQUEZ-TUDELA, J. L.; DONNELLY, J. P.; VERWEIJ, P. E. *In vitro* activities of new and conventional antifungal agents against clinical *Scedosporium* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 1, p. 62–68, 2002.

MESA-ARANGO, A. C.; MONTIEL-RAMOS, J.; ZAPATA, B.; DURÁN, C.; BETANCUR-GALVIS, L.; STASHENKO, E. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of *Colombian Lippia* alba (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 6, p. 878–884, set. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762009000600010&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

MESA-ARANGO, A. C.; TREVIJANO-CONTADOR, N.; ROMAN, E.; SANCHEZ-FRESNEDA, R.; CASAS, C.; HERRERO, E.; ARGUELLES, J. C.; PLA, J.; CUENCA-ESTRELLA, M.; ZARAGOZA, O. The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of amphotericin B against pathogenic yeasts

and contributes to the fungicidal effect of this drug. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 11, p. 6627–6638, nov. 2014.

MITCHELL, D. H.; TANIA, C. S.; ANTHONY, M. ALLWORTH CHRISTOPHER, H. HEATH ALASTAIR, R. M.; KELLY, P.; RICHARDS, M. J.; THOMAS, G. Cryptococcal disease of the CNS in immunocompetent hosts: influence of Cryptococcal variety on clinical manifestations and outcome. **Clin Infect Dis**, v. 20, n. 3, p. 611–616, 1995.

MOREY, A. T.; DE SOUZA, F. C.; SANTOS, J. P.; PEREIRA, C. A.; CARDOSO, J. D.; DE ALMEIDA, R. S. C.; COSTA, M. A.; DE MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, C. V; PINGE-FILHO, P.; YAMAUCHI, L. M.; YAMADA-OGATTA, S. F. Antifungal Activity of Condensed Tannins from *Stryphnodendron adstringens*: Effect on *Candida* tropicalis Growth and Adhesion Properties. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 17, n. 4, p. 365–75, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26696018>.

MORGAN, J.; MELTZER, M.; PLIKAYTIS, B. D.; SOFAIR, A. N.; HUIE-WHITE, S.; WILCOX, S.; HARRISON, L. H.; SEABERG, E. C.; HAJJEH, R. A.; TEUTSCH, S. M. Excess mortality, hospital stay, and Cost due to candidemia: a case–control study using data from population-based candidemia surveillance. **INFECTION CONTROL AND HOSPITAL EPIDEMIOLOGY**, v. 26, n. 6, p. 440–447, 2005.

MORIO, F.; PAGNIEZ, F.; LACROIX, C.; MIEGEVILLE, M.; LE PAPE, P. Amino acid substitutions in the *Candida albicans* sterol Δ5,6-desaturase (Erg3p) confer azole resistance: characterization of two novel mutants with impaired virulence. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 9, p. 2131–2138, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MOURI, R.; KONOKI, K.; MATSUMORI, N.; OISHI, T.; MURATA, M. Complex formation of amphotericin B in sterol-containing membranes as evidenced by surface plasmon resonance. **Biochemistry**, v. 47, n. 30, p. 7807–7815, 2008.

MÜLLER, V.; CHÁVEZ, J. H.; REGINATTO, F. H.; ZUCOLOTTO, S. M.; NIERO, R.; NAVARRO, D.; YUNES, R. A.; SCHENKEL, E. P.; BARARDI, C. R.; ZANETTI, C. R.; SIMÕES, C. M. Evaluation of antiviral activity of South American plant extracts against herpes simplex virus type 1 and rabies virus. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 10, p. 970–974, 2007.

MUNAYYER, H. K.; MANN, P. A.; CHAU, A. S.; YAROSH-TOMAINE, T.; GREENE, J. R.; HARE, R. S.; HEIMARK, L.; PALERMO, R. E.; LOEBENBERG, D.; MCNICHOLAS, P. M. Posaconazole is a potent inhibitor of sterol 14-demethylation in yeasts and molds. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 10, p. 3690–3696, 2004.

NASCIMENTO, E. A.; MORAIS, S. A. L. Polifenóis da madeira de *Eucalyptus grandis*. Parte 1: análise por espectroscopia e cromatografia líquida. **Ciência & Engenharia**, v. 5, n. 2, p. 13–18, 1996.

NOGUEIRA, I. A.; LEÃO, A. B. B.; VIEIRA, M. S.; BENFICA, P. L.; CUNHA, L. C.; VALADARES, M. C. Antitumoral and antiangiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 3, p. 474–478, 2008.

NOVAK, M.; PLEŠKO, S. Epidemiology and fungal infection risk factors in patients hospitalized in neonatal and paediatric intensive care units – a multicentre pilot study. **Signa Vitae - A Journal In Intensive Care And Emergency Medicine**, v. 11, n. Suppl 2, p. 51–56, 14 jun. 2016. Disponível em: <http://www.signavitae.com/2016/06/epidemiology-and-fungal-infection-risk-factors-in-patients-hospitalized-in-neonatal-and-paediatric-intensive-care-units-a-multicentre-pilot-study/>.

ODOM, A; MUIR, S.; LIM, E.; TOFFALETTI, D. L.; PERFECT, J.; HEITMAN, J. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. **The EMBO journal**, v. 16, n. 10, p. 2576–2589, 1997.

OKUDA, T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 66, n. 17, p. 2012–2031, 2005.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. Classification of oligomeric hydrolysable tannins and specificity of their occurrence in plants. **Phytochemistry**, v. 32, p. 507–521, 1993.

ONISHI, J.; MEINZ, M.; THOMPSON, J.; CUROTTO, J.; DREIKORN, S.; ROSENBACH, M.; DOUGLAS, C.; ABRUZZO, G.; FLATTERY, A.; KONG, L.; CABELLO, A.; VICENTE, F.; PELAEZ, F.; DIEZ, M. T.; MARTIN, I.; BILLS, G.; GIACOBBE, R.; DOMBROWSKI, A.; SCHWARTZ, R.; MORRIS, S.; HARRIS, G.; TSIPOURAS, A.; WILSON, K.; KURTZ, M. B. Discovery of Novel Antifungal (1,3)-β-d-Glucan Synthase Inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 2, p. 368–377, 2000.

OSTROSKY-ZEICHNER, L.; CASADEVALL, A.; GALGIANI, J. N.; ODDS, F. C.; JOHN, J. H. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 9, p. 719–729, 2010.

PAPPALARDO, M. C. S. M. **Parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos da anfotericina B e fluconazol e sua contribuição no estudo da correlação clínico-laboratorial da criptococose de sistema nervoso central associada à AIDS**. 2009.

PARK, B. J.; WANNEMUEHLER, K. A.; MARSTON, B. J.; GOVENDER, N.; PAPPAS, P. G.; CHILLER, T. M. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **Aids**, v. 23, n. 4, p. 525–530, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19182676>.

PEMÁN, J.; CANTÓN, E.; ESPINEL-INGROFF, A. Antifungal drug resistance mechanisms. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 7, n. 4, p. 453–460, 2009.

PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*: a sugar-coated killer with designer genes. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 395–404, 2005.

PERFECT, J. R. Fungal diagnosis: how do we do it and can we do better? **Current medical research and opinion**, v. 29 Suppl 4, n. January, p. 3–11, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23621588>.

PERFECT, J. R.; DROMER, F.; DISMUKES, W. E.; GOLDMAN, D. L.; GRAYBIL, J. R.; HAMILL, R. J.; LARSEN, T. S. H. R. A.; LORTHOLARY, O.; NGUYEN, M.-H.; PAPPAS, P. G.; POWDERLY, W. G.; SINGH, N.; SOBEL, J. D.; SORRELL, T. C. 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.

PFALLER, M. A.; ANDES, D. R.; DIEKEMA, D. J.; HORN, D. L.; REBOLI, A. C.; COLEMAN, R.; BILLY, F.; AZIE, N. E. Epidemiology and Outcomes of Invasive Candidiasis Due to Non-albicans Species of *Candida* in 2,496 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) Registry 2004–2008. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e101510, 2014.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; JONES, R. N.; GROUP., I. F. S. P. *In vitro* activities of voriconazole, posaconazole, and four licensed systemic antifungal agents against *Candida* species infrequently isolated from blood. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 78–83, 2003.

PFALLER, M. A.; DIEKEMAA, D. J. Epidemiology of invasive mycoses in North America. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 1–53, 2010.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; BOYKEN, L.; RICE, C.; TENDOLKAR, S.; HOLLIS, R. J.; DOERN, G. V; DIEKEMA, D. J. Global trends in the antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990 to 2004). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2163–2167, 2005.

PHILLIPS, P.; GALANIS, E.; MACDOUGALL, L.; CHONG, M. Y.; BALSHAW, R.; COOK, V. J.; BOWIE, W.; STEINER, T.; HOANG, L.; MORSHED, M.; GHESQUIERE, W.; FORREST, D. M.; ROSCOE, D.; DOYLE, P.; KIBSEY, P. C.; CONNOLLY, T.; MIRZANEJAD, Y.; THOMPSON, D. Longitudinal Clinical Findings and Outcome Among Patients With *Cryptococcus gattii* Infection in British Columbia. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 60, p. 1–9, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25632012>.

PIANALTO, K.; ALSPAUGH, J. New horizons in antifungal therapy. **Journal of Fungi**, v. 2, n. 4, p. 26, 2 out. 2016. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2309-608X/2/4/26>.

PIMENTA, D. O. M. M. **Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica e antibacteriana de extratos de Pothomorphe umbellata E Struthantus sp e análise da expressão protéica**. 2008. Universidade de Ribeirão Preto, 2008.

PINA-VAZ, C.; SANSONETTY, F.; RODRIGUES, A. G.; COSTA-OLIVEIRA, S.; TAVARES, C.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J. Cytometric approach for a rapid evaluation of susceptibility of *Candida* strains to antifungals. **Clinical Microbiology**

and Infection, v. 7, n. 11, p. 609–618, 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1198-743x.2001.00307.x>.

POLVI, E. J.; XINLIU, L.; O'MEARA, T. R.; LEACH, M. D.; COWEN, L. E. Opportunistic yeast pathogens: reservoirs, virulence mechanisms, and therapeutic strategies. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, p. 2261–2287, 2015.

PRIETO, P.; COLE, T.; CURREN, R.; GIBSON, R. M.; LIEBSCH, M.; RAABE, H.; TUOMAINEN, A. M.; WHELAN, M.; KINSNER-OVASKAINEN, A. Assessment of the predictive capacity of the 3T3 Neutral Red Uptake cytotoxicity test method to identify substances not classified for acute oral toxicity (LD50>2000mg/kg): Results of an ECVAM validation study. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 65, n. 3, p. 344–365, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.11.013>.

PROENÇA, C.; OLIVEIRA, R. S.; SILVA, A. P. **Flores e frutos do cerrado**. Brasilia: São Paulo: Imprensa oficial, 2000.

REDDY, B. U.; MULLICK, R.; KUMAR, A.; SUDHA, G.; SRINIVASAN, N.; DAS, S. Small molecule inhibitors of HCV replication from pomegranate. **Scientific reports**, v. 4, p. 5411, 2014. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4067622&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

REDDY, M.; GUPTA, S.; JACOB, M.; KHAN, S.; FERREIRA, D. Antioxidant, Antimalarial and Antimicrobial Activities of Tannin-Rich Fractions, Ellagitannins and Phenolic Acids from *Punica granatum* L. **Planta Medica**, v. 73, n. 5, p. 461–467, maio 2007. Disponível em: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2007-967167>.

REICHLING, J.; SCHNITZLER, P.; SUSCHKE, U.; SALLER, R. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties--an overview. **Forsch Komplementmed**, v. 16, n. 2, p. 1661–4119, 2009.

REIS, M. P. C.; CARVALHO, C. R. C.; ANDRADE, F. A.; FERNANDES, O. F. L.; ARRUDA, W.; SILVA, M. R. R. Fisetin as a promising antifungal agent against *Cryptococococcus neoformans* species complex. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 2, p. 373–379, 2016.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. Nature Protocols. **Nature Protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125–1131, 2008.

RIBEIRO, T. G.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; VALADARES, D. G.; FRANCA, J. R.; LAGE, P. S.; DUARTE, M. C.; ANDRADE, P. H. R.; MARTINS, V. T.; COSTA, L. E.; ARRUDA, A. L. A.; FARACO, A. A. G.; COELHO, E. A. F.; CASTILHO, R. O. Antileishmanial activity and cytotoxicity of Brazilian plants. **Experimental Parasitology**, v. 143, n. 1, p. 60–68, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2014.05.004>.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **NATURE PROTOCOLS**, v. 1, n. 3, p. 1458–1461, 2006.

RODRIGUES, M. L.; ALVIANO, C. S.; TRAVASSOS, L. R. Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*: virulence factors and immunological mechanisms. **Microbes and Infection**, v. 1, n. 4, p. 293–301, 1999.

ROGERIO, A. P.; FONTANARI, C.; MELO, M. C.; AMBROSIO, S. R.; DE SOUZA, G. E.; PEREIRA, P. S.; FRANÇA, S. C.; DA COSTA, F B ALBUQUERQUE, D. A.; FACCIOLI, L. H. Anti-inflammatory, analgesic and anti-oedematous effects of *Lafoensia pacari* extract and ellagic acid. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 58, n. 9, p. 1265–1273, 2006.

ROSSI, S. A.; TREVIJANO-CONTADOR, N.; SCORZONI, L.; MESA-ARANGO, A. C.; DE OLIVEIRA, H. C.; WERTHER, K.; DE FREITAS RASO, T.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; ZARAGOZA, O.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. Impact of resistance to fluconazole on virulence and morphological aspects of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 16 fev. 2016. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00153/abstract>.

SAAG, M. S.; DISMUKES, W. E. Azole antifungal agents: emphasis on new triazoles. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 32, n. 1, p. 1–8, 1988.

SABATELLI, F.; PATEL, R.; MANN, P. A.; MENDRICK, C. A.; NORRIS, C. C.; HARE, R.; LOEBENBERG, D.; BLACK, T. A.; MCNICHOLAS, P. M. *In vitro* activities of Posaconazole, Fluconazole, Itraconazole, Voriconazole, and Amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 6, p. 2009–2015, 2000.

SANGALLI-LEITE, F.; SCORZONI, L.; MESA-ARANGO, A. C.; CASAS, C.; HERRERO, E.; GIANINNI, M. J.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J L CUENCA-ESTRELLA M, Z. O. Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 5, p. 457–467, 2011.

SANGLARD, D. Emerging Threats in Antifungal-Resistant Fungal Pathogens. **Frontiers in Medicine**, v. 3, n. March, p. 1–10, 2016. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmed.2016.00011>.

SANGLARD, D.; ISCHER, F.; MONOD, M.; BILLE, J. Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. **Microbiology**, v. 143, p. 405–416, 1997.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLÖRL, C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58, n. Suppl. 2, p. 2–13, jun. 2015. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/myc.12330>.

SANTANGELO, R.; ZOELLNER, H.; SORRELL, T.; WILSON, C.; DONALD, C.; DJORDJEVIC, J.; SHOUNAN, Y.; WRIGHT, L. Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of cryptococcosis in a murine model. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 4, p. 2229–2239, 2004.

SANTOS, R. I.; MELO, J. C. P. Taninos. In: UFSC (Ed.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. [s.l: s.n.]p. 615–656, 2007.

SEIDI, K.; JAHANBAN-ESFAHLAN, R.; ABASI, M.; ABBASI, M. M. Anti Tumoral Properties of *Punica granatum* (Pomegranate) Seed Extract in Different Human Cancer Cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 17, n. 3, p. 1119–1122, 11 abr. 2016. Disponível em: <http://koreascience.or.kr/journal/view.jsp?kj=POCPA9&py=2016&vnc=v17n3&sp=1119>.

SHAH, T. A.; PARIKH, M.; PATEL, K. V.; PATEL, K. G.; JOSHI, C. G.; GANDHI, T. R. Evaluation of the effect of *Punica granatum* juice and punicalagin on NFκB modulation in inflammatory bowel disease. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 2016.

SHAO, J.; WANG, P.; LIU, A.; DU, X.; BAI, J.; CHEN, M. Punicalagin Prevents Hypoxic Pulmonary Hypertension via Anti-Oxidant Effects in Rats. **Am J Chin Med**, v. 44, n. 4, p. 785–801, 2016.

SHAPIRO, R. S.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Regulatory Circuitry Governing Fungal Development , Drug Resistance , and Disease. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 2, p. 213–267, 2011.

SHEPPARD, D.; LAMPIRIS, H. W. Agentes antifúngicos. In: **Farmacologia Básica e Clínica**. [s.l.] McGraw-Hill, 2008. p. 707–714.

SHIMAMURA, Y.; AOKI, N.; SUGIYAMA, Y.; TANAKA, T.; MURATA, M.; MASUDA, S. Plant-derived polyphenols interact with staphylococcal enterotoxin A and inhibit toxin activity. v. 11, n. 6, p. 1–13, 2016.

SILVA, L. N.; TRENTIN, D. S.; ZIMMER, K. R.; TRETER, J.; BRANDELLI, C. L.; FRASSON, A. P.; TASCA, T.; DA SILVA, A. G.; DA SILVA, M. V.; MACEDO, A. J. Anti-infective effects of Brazilian Caatinga plants against pathogenic bacterial biofilm formation. **Pharm Biol**, v. 53, n. 3, p. 464–468, 2015a.

SILVA, L. P.; DE ANGELIS, C. D.; BONAMIN, F.; KUSHIMA, H.; JOSÉ MININEL, F.; DOS SANTOS, L. C.; DELELLA, F. K.; FELISBINO, S. L.; VILEGAS, W.; MACHADO DA ROCHA, L. R.; DOS SANTOS RAMOS, M. A.; BAUAB, T. M.; TOMA, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. Terminalia catappa L.: A medicinal plant from the Caribbean pharmacopeia with anti-*Helicobacter pylori* and antiulcer action in experimental rodent models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 159, p. 285–295, 2015b. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.11.025>.

SILVA, O.; VIEGAS, S.; DE MELLO-SAMPAYO, C.; COSTA, M. J. P.; SERRANO, R.; CABRITA, J.; GOMES, E. T. Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Terminalia* macroptera root. **Fitoterapia**, v. 83, n. 5, p. 872–876, 2012a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2012.03.019>.

SILVA, S.; PINHEIRO, S.; MARIA, Q.; MARIA, P.; JOSÉ, C.; MICHELE, P.; SOLANGE, C. Atividade *in vitro* de extratos brutos de duas espécies vegetais do

cerrado sobre leveduras do gênero *Candida*. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, n. 6, p. 1649–1656, 2012b.

SILVA JUNIOR, I. F.; RAIMONDI, M.; ZACCHINO, S.; CECHINEL FILHO, V.; NOLDIN, V. F.; RAO, V. S.; LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O. Evaluation of the antifungal activity and mode of action of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, stem-bark extracts, fractions and ellagic acid. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 422–428, 2010.

SOKOL-ANDERSON, M.; J E SLIGH, J.; ELBERG, S.; BRAJTBURG, J.; KOBAYASHI, G. S.; MEDOFF, G. Role of cell defense against oxidative damage in the resistance of *Candida albicans* to the killing effect of amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 32, n. 5, p. 702–705, 1988.

SOKOL-ANDERSON, M. L.; BRAJTBURG, J.; MEDOFF, G. Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. **Journal Infectious Diseases**, v. 154, n. 1, p. 76–83, 1986.

SOLON, S.; LOPES, L.; SOUSA P JR, T.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Free radical scavenging activity of *Lafoensia pacari*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 1–2, p. 173–178, 2000.

SOUZA, A. C.; FUCHS, B. B.; PINHATI, H. M.; SIQUEIRA, R. A.; HAGEN, F.; MEIS, J. F.; MYLONAKIS, E.; COLOMBO, A. L. *Candida parapsilosis* Resistance to Fluconazole: Molecular Mechanisms and *In Vivo* Impact in Infected *Galleria mellonella Larvae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 10, p. 6581–6587, 2015.

SOUZA, L. K. H. e; OLIVEIRA, C. M. A. de; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C.; OLIVEIRA JÚNIOR, J. G. de; MIRANDA, A. T. B.; LIÃO, L. M.; SILVA, M. do R. R. Antifungal properties of Brazilian cerrado plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 618–623, set. 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822002000300012&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

SPITZER, M.; ROBBINS, N.; WRIGHT, G. D. Combinatorial Strategies For Combating Invasive Fungal Infections. **Virulence**, v. 0, n. 0, p. 1–17, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27268286>.

SPRINGER, D. J.; CHATURVEDI, V. Projecting Global Occurrence of *Cryptococcus gattii*. **Synopsis**, v. 16, n. 1, p. 14–20, 2010.

SRIKANTA, D.; SANTIAGO-TIRADO, F. H.; DOERING, T. L. *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. **Yeast**, v. 31, n. 2, p. 47–60, 2014.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current Protocols in Immunology**, v. 3, n. 3B, 2001.

TALEB, H.; MADDOCKS, S. E.; MORRIS, R. K.; KANEKANIAN, A. D. The antibacterial activity of date syrup polyphenols against *S. aureus* and *E. coli*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. February, p. 1–9, 2016. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00198/abstract>.

TANAKA, T.; NONAKA, G.; NISHIOKA, I. Tannins and related compounds. XL: Revision of the structures of punicalin and punicalagin, and isolation and characterization of 2-O-galloylpunicalin from the bark of *Punica granatum* L. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, p. 650–655, 1986.

TAYLOR, B. N.; HARRER, T.; PSCHEIDL, E.; SCHWEIZER, A.; RÖLLINGHOFF, M.; SCHRÖPPEL, K. Surveillance of nosocomial transmission of *Candida albicans* in an intensive care unit by DNA fingerprinting. **The journal of hospital infection**, v. 55, n. 4, p. 283–289, 2003.

THANNICKAL, V. J.; FANBURG, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular**, v. 279, n. 6, p. L1005-28, 2000.

TIAN, J.; BAN, X.; ZENG, H.; HE, J.; CHEN, Y.; WANG, Y. The Mechanism of Antifungal Action of Essential Oil from Dill (*Anethum graveolens* L.) on Aspergillus flavus. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. e30147, 17 jan. 2012. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0030147>.

TYAGI, S. Fungal pathogenicity and diseases in human – A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 5, n. 6, p. 192–193, 2016.

WANESS, A.; DAWSARI, G. A.; AL JAHDALI, H. The rise of an opportunistic infection called "Invasive Zygomycosis". **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 131–138, 2009.

WANG, S.; HUANG, M.; LI, J.; LAI, F.; LEE, H.; HSU, Y. Punicalagin induces apoptotic and autophagic cell death in human U87MG glioma cells. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 34, n. 11, p. 1411–9, 2013. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4006469&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

WIEDERHOLD, N. P.; GRABINSKI, J. L.; GARCIA-EFFRON, G.; PERLIN, D. S.; LEE, S. A. Pyrosequencing To Detect Mutations in FKS1 That Confer Reduced Echinocandin Susceptibility in *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 11, p. 4145–4148, 2008.

WILLIAMSON, P. R. Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, n. 2, p. 99–107, 1997.

WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S. M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R. P.; EDMOND, M. B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, p. 309–317, 2004.

XIAO, Y.; TANG, J.; GUO, H.; ZHAO, Y.; TANG, R.; OUYANG, S.; ZENG, Q.; RAPPLEYE, C.; RAJARAM, M, V, S.; SCHLESINGER, L, S.; TAO, L.; BROWN, G, D.; LANGDON, W, Y.; LI, B, T.; ZHANG, J. Targeting CBLB as a potential therapeutic approach for disseminated candidiasis. **Nature Medicine**, v. 22, n. 8, p. 906–914, 2016.

XIE, J. L.; POLVI, E. J.; SHEKHAR-GUTURJA, T.; COWEN, L. E. Elucidating drug resistance in human fungal pathogens. **Future Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 523–42, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24810351>.

XU, Y.; BURTON, S.; KIM, C.; SISMOUR, E. Phenolic compounds, antioxidant, and antibacterial properties of pomace extracts from four Virginia-grown grape varieties. **Food science & nutrition**, v. 4, n. 1, p. 125–33, 2016. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4708636&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

YOSHIDA, T.; AMAKURA, Y.; YOSHIMURA, M. Structural features and biological properties of ellagitannins in some plant families of the order myrtales. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 1, p. 79–106, 2010.

ZORIĆ, N.; KOPJAR, N.; BOBNJARIĆ, I.; HORVAT, I.; TOMIĆ, S.; KOSALEC, I. Antifungal Activity of Oleuropein against *Candida albicans* - The *In vitro* Study. **Molecules**, v. 21, n. 12, p. 1631, 28 nov. 2016. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/12/1631>.

ANEXOS

Anexo A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Doenças Transmissíveis "Dr. Anuar Auad"

COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA / HDT

PARECER

PROJETO: Variabilidade fenotípica e genotípica de *Cryptococcus neoformans* obtidos do meio ambiente e de amostras clínicas da cidade de Goiânia-GO.

AUTORA: Lúcia Kioko Hashimoto e Souza **ORIENTADORA**: Maria do Rosário R. Silva

Avaliamos o projeto supracitado e consideramos que o mesmo atende as normas preconizadas pelo CONEPE e os preceitos preceitos éticos vigentes, não havendo, portanto impedimentos para sua condução nesta instituição.
Este é o nosso parecer, salvo melhor juízo.

Goiânia, 25 de Abril de 2003.

Dr. João Alves de Araújo Filho

Anexo B - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas-UFG

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
HOSPITAL DAS CLÍNICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA MÉDICA HUMANA E ANIMAL

PROTOCOLO CEPMHA/HC/UFG N.º 065/2008 **Goiânia, 26/06/2008**

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES): *Profª. Dra. Maria do Rosário Rodrigues Silva*

TÍTULO: *"Isolamento e identificação de dermatófitos isolados de pacientes com onicomicose. Suscetibilidade In Vitro e Genotipagem."*

Área Temática: *Grupo II – Testes Diagnósticos*
Área de Conhecimento: *Ciências Biológicas - Microbiologia*
Local de Realização: *IPTSP - UFG*

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, após análise e atendimento à adequação solicitada, **aprovou,** o projeto de Pesquisa acima referido, juntamente com os documentos apresentados e estes foram considerados em acordo com os princípios éticos vigentes.

- Informamos que **não há** necessidade de aguardar o parecer da CONEP- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

- **O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPMHA/HC/UFG, relatórios trimestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões).**

- O CEPMHA/HC/UFG pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 196/96 (*Manual Operacional Para Comitês de Ética em Pesquisa – Item 13*)

Farm. José Mário Coelho Moraes
Coordenador do CEPMHA/HC/UFG

APÊNDICE

Apêndice A- Antifungal potential of punicalagin against Cryptococcus neoformans species complex and *Candida* species

Thaísa Cristina Silva[a]; Ana Laura de Sene Amâncio Zara[a]; Fabyola Amaral da Silva Sá[b], Maria Teresa Freitas Bara[b]; Renato Ivan de Ávila[b], Carolina Rodrigues Costa[a], Marize Campos Valadares[b], Maria do Rosário Rodrigues Silva[a]

[a]Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

[b]Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

Corresponding author: Maria do Rosário Rodrigues Silva, Rua 235 esquina c/ 1ª Avenida, s/n°, 3° andar, Sala 426, Setor Universitário, Goiânia, Goiás, Brasil. CEP: 74605-050. E-mail: rosario@ufg.br. Contact number: +55-62-99436-4242.

Abstract

Objective: This study evaluated the antifungal activity and cytotoxicity profile of the ellagitannin punicalagin, a compound extracted from the leaf of *L. pacari* A.St.-Hil (Lythraceae), against *Cryptococcus neoformans* species complex and *Candida* sp.

Methods: The minimum inhibitory concentrations (MIC) were checked using the broth microdilution method. Minimum fungicidal concentrations (MFC) and time of death were used to confirm the antifungal activity of the compound. The *in vitro* cytotoxicity of punicalagin was verified using (Balb/c 3T3 fibroblasts; human lung cancer cell line, A549 and sheep red blood cells). The morphological changes of these yeasts in presence of punicalagin were also analyzed.

Results: The MIC and MFC in eight isolate of the *C. neoformans* complex showed MIC of 0.5 to 4.0 μg/mL and MFC> 256 μg/mL. Six isolates of *Candida* species presented MIC of 4.0 μg/mL and MFC> 256 μg/mL. Punicalagin demonstrated good growth inhibitory activity in time-kill curves, but it was not able to statistically reduce fungal growth which shows the fungistatic effect of the compound. *In vitro* cytotoxicity studies against three cell lines indicated that punicalagin has low activity on these cells. Morphological changes were seen in yeasts studied when treated with punicalagin. The cells of *C. neoformans* species complex had rough walls and were shrivel, while the cells of *Candida* species had scar surfaces and reduced number of blastoconidia.

Conclusions: Our results suggest that punicalagin has antifungal potential on important pathogenic yeasts and presents low cytotoxicity to animal cells.

Keywords: Punicalagin; *Lafoensia pacari* A.St.-Hil; Cytotoxicity; Antifungal activity; *Cryptococcus neoformans* species Complex; *Candida* sp.

1. Introduction

Punicalagin extracted from *Punica granatum* (Punicaceae) [1], *Terminalia* species (Combrethaceae) [2], and *Lafoensia pacari* A. St.-Hil (Lythraceae) is a compound that has medicinal properties [3]. The ellagitannin punicalagin, has demonstrated activity against *Cryptococcus neoformans* species complex, dermatophytes, and some species of *Candida* [4–7].

Cryptococcus neoformans species complex and *Candida* species are the main yeasts responsible for invasive fungal infections in humans [8]. Cryptococcosis is a severe systemic mycosis, with worldwide spread [9], and its prevalence is estimated to be more than one million cases and cause about 650 000 deaths annually [10]. Infections with *Cryptococcus gattii* have a protracted course of illness [11], and it is well known that *C. gattii* isolates are significantly less susceptible to azoles than the isolates of *C. neoformans* [12,13].

Candidiasis is an essentially opportunistic disease caused by commensal yeasts of *Candida* species, which in certain situations can generate superficial or systemic infection [14,15], associated with high rates of morbidity and mortality in critically ill patients [16,17].

These fungal infections are mainly connected with resistance to available antifungal drugs [18]. The development of new products showing broad spectrum of action and low toxicity is extremely necessary.

Thus, the present study aims to evaluate antifungal activity and, cytotoxicity of punicalagin phenolic compound extracted from *L. pacari* leaf against *C. neoformans* species complex and *Candida* species, as well as analyzes the morphological changes of these yeasts in presence of punicalagin.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Punicalagin was extracted from leaves of *L. pacari* A. St.-Hil (Lythraceae) and characterized by HPLC/UV and ESI-TOF MS, 1D and 2D NMR spectroscopic evaluations as described by Carneiro et al. [3].

The yeast strains used in this study include: *C. neoformans* ATCC 28957, *C. gattii* ATCC 24065, six clinical isolates of *C. neoformans* species complex (three *C.*

gattii - L1, L9, and L20 and three *Cryptococcus neoformans* - L3, L29, and L30), as well as *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 and four clinical isolates of *Candida* species (two *C. parapsilosis* - 21 and 77, one *Candida guilliermondii* - 97 and one *C. albicans* - 111).

2.2. Microdilution broth assay

The *in vitro* activity of punicalagin was measured by means of microdilution broth method, according to in Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) documents M27-A3 [19] and M27- S4 [20] for yeasts. Serial twofold dilutions of pure compound were done in 96-well microplates. The minimal inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest concentration that resulted in total inhibition of visible growth.

The minimal fungicidal concentration (MFC) was determined by an inoculum of 10 µL of the MIC and of up to 4 × MIC seeded in petri plates containing Sabouraud dextrose agar (SDA). The plates were incubated for 72 h at 35 °C for *C. neoformans* species complex and 48 h for *Candida* sp. The minimum fungicidal concentration (MFC) was defined as the lowest concentration of the compound that resulted in growth of less than two colonies representing the death of > 99% of the original inoculum. Fluconazole was used as control.

2.3. Time kill assay

The death curve of the yeasts was performed according to the modified protocols of Klepser et al. [21] and Silva et al. [22]. In this work, we used standard strains of *C. neoformans* ATCC 28957, *C. gattii* ATCC 24065, *C. albicans* ATCC 90028, and *C. parapsilosis* ATCC 22019.

Dilutions of 1/10 in RPMI-1640 broth containing approximately 1 to 5 × 10^6 CFU/mL. (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) were carried out from these suspensions in such a way as to obtain the initial concentration of 1 to 5 × 10^5 CFU/mL. The fungal suspension was added to punicalagin to obtain concentrations of ½ MIC (2µg/mL), MIC (4µg/mL), and 2 × MIC (8µg/mL) of this compound. Colony counts were performed after removal of 100 µL of these samples diluted from 10^{-2} to 10^{-5} on RPMI-1640 broth. Aliquots of 10 µL of this suspension were plated in SDA and incubated at 35 °C for 6, 12, 24, 48, and 72 h for *C. neoformans* species complex and for 3, 6, 12, 24, and 48 h for *Candida* sp.

2.4 Cytotoxicity assays

2.4.1 Cell cultures

The Balb/c 3T3 A31 fibroblasts and A549 human lung cells were cultured in DMEM and Ham's F12 nutrient mixture, respectively, supplemented with heat-inactivated FBS (10%, v/v), HEPES (4.5 mM), sodium bicarbonate (0.17 M), L-glutamine (2 mM), in a humidified atmosphere of 5% CO_2 in air at 37 °C. When cells reached approximately 70% confluence, they were harvested with trypsin (0.025%)/EDTA (0.02%) solution. Cell viability was previously analyzed using bTC20^{TM} automated cell counter (Hercules, CA, USA), according to manufacturer's instructions, and a value > 90% was considered satisfactory to conduct the assays.

2.4.1.1 3T3 neutral red uptake (NRU) assay

The 3T3 NRU assay was performed according to the standard protocol of Borenfreund and Puerner (1985) [23] modified by ICCVAM [24]. In brief, 3T3 fibroblasts (3×10^4 cells/well) were seeded in 96-well plates overnight. Cells were then treated with nine different concentrations of punicalagin (0.78-200 µg/mL) in complete medium for 48 h. Amphotericin B (0.78-200 µg/mL) was used as reference drug. After incubation, the supernatant was removed and the cells were washed with PBS (250 µL/well) followed by addition of neutral red (0.25 mg/mL) diluted in medium (250 µL/well). After 3 h of incubation, the neutral red medium was removed and the cells were washed with 250 µL/well of PBS. After that, 100 µL of neutral red (50 ethanol: 1 acetic acid:49 ultrapure water) solution were added to all wells. Absorbance was measured at 550 nm in a spectrophotometer (Thermo Scientific Multiskans Spectrum, Boston, MA, USA). Cell viability was expressed as a percentage of the control. A concentration-response curve was obtained to determine the concentration of punicalagin or amphotericin B that inhibited cell growth by 50% compared to untreated group (IC_{50}).

2.4.1.2 MTT assay of A549 human lung cells

Cytotoxicity analysis in A549 cells was performed using MTT reduction test, adapted from Mosmann (1983) [25]. Briefly, A549 cells (1×10^5 cells/mL) were seeded in 96-well plates overnight and then treated with nine different concentrations of punicalagin (0.78-200 µg/mL) in complete medium for 45 h. Amphotericin B (0.78-200 µg/mL) was used as reference drug. After incubation period, 10 µL of MTT (5 mg/mL)

were added to each well and incubated for additional 3 h. Subsequently, the supernatant was removed and 100 µL DMSO was added to each well. Absorbance was measured at 560 nm. Cell viability was expressed as a percentage of the control, and IC_{50} and SI values were determined.

2.4.3 Hemolytic assay

Hemolytic assay was performed according with to He et al. [26]. The 10% sheep erythrocytes/PBS 10% suspension was then diluted 1:10 in PBS. From each suspension, 100 µL was added in triplicate to 100 µL of a two-fold dilution series of punicalagin (256 to 1 µg/mL) or amphotericin B (8 to 0.031 µg/mL) in the same buffer in Eppendorf tubes. The tubes were incubated for 30 min at 37 °C, and then centrifuged for 5 min at 3.000 rpm. From the supernatant fluid, 150 µl/mL were transferred to a flat bottom microtiter plate and absorbance was measured using a spectrophotometer at 450 nm. Total hemolysis was achieved with 1% Triton X-100 solution. The hemolysis percentage was calculated according to He et al. [26].

2.5. Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy (SEM) analysis was performed according to Faganello et al. [27] with some modifications. The yeast isolates were cultured in SDA containing a corresponding concentration to MIC (4 µg/mL) of punicalagin and incubated at 30 °C for 72 h for *C. neoformans* ATCC 28367, *C. gattii* ATCC 24065, and for 48 h for *C. albicans* ATCC 90028 and *C. parapsilosis* ATCC 22019. Small blocks of each fungal sample were withdrawn and fixed in 2% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer with 3% saccharose at pH 7.2 and kept overnight at 4 °C.

Samples were washed in the same buffer four times, dehydrated in ethyl alcohol and dried in a critical-point in CO_2 (Autosamdri®, 815, Series A) covered with gold (Denton Vacuum, Desk V) and analyzed in Jeol, JSM-6610 scanning electron microscope.

2.7. Statistical analysis

Data were expressed as mean or mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments. The inter group variation was measured by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test using GraphPad Prism 5.01

software (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA). Statistical significance was established as $p<0.05$.

3. Results

3.1 Broth microdilution assay

Punicalagin showed antifungal activity on species of the *C. neoformans* complex, with a MIC range of 0.5 to 4.0 µg/mL and CFM> 256 µg/mL for all isolates. At the concentration of 0.5 µg/mL the compound inhibited 37% of the C. *neoformans* species complex isolates. All *Candida* isolates had a MIC of 4.0 µg/mL and CFM> 256 µg/mL when exposed to punicalagin.

3.2 Time kill curve

Time-kill curve showed reduction in the number of CFU/mL of yeast of the *C. neoformans* complex treated with punicalagin at concentrations corresponding to the MIC (4 µg/mL) and 2 × MIC (8 µg/mL). The major reduction was observed with *C. neoformans* ATCC 28957 at the concentration corresponding to 2 × MIC at 12 hours. However, the difference was not statistically significant between treated and non-treated cells. Amphotericin B had maximum fungicidal activity after 12 hours of incubation at concentrations equivalent to 1 µg/mL for *C. gattii* ATCC 24065 and *C. neoformans* ATCC 28957. The death curve of *C. neoformans* species complex isolates for punicalagin and amphotericin B is showed in Fig. 1 (A and B).

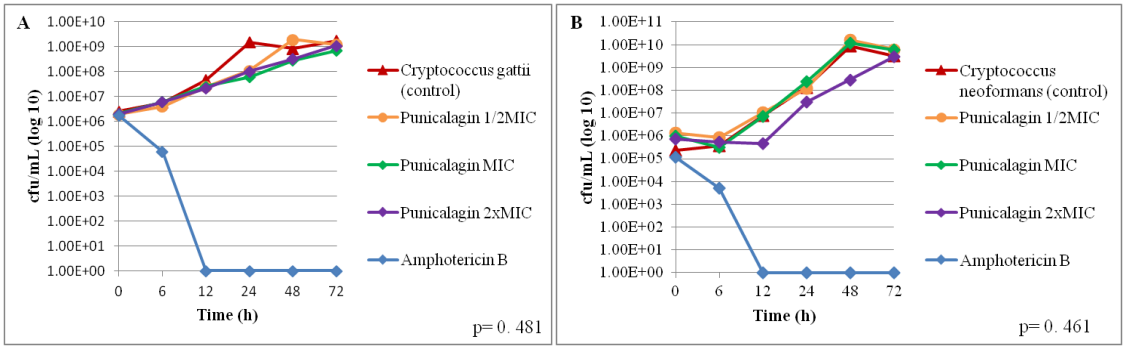

Fig. 1. Growth curve of *C. gattii* ATCC 24065 (A) and *C. neoformans* ATCC 28957 (B) treated with punicalagin at the values corresponding to half the minimum inhibitory concentration MIC (0.25 µg/mL), MIC (0.5 µg/mL), and 2 × MIC (1 µg/mL) and amphotericin B in MIC (0.5 µg/mL) after 6, 12, 24, 48, and 72 hours of incubation (A and B).

C. albicans ATCC 90028 and *C. parapsilosis* ATCC 22019 treated with punicalagin showed a reduction in the number of CFU/mL at different incubation times. This cell reduction presented by *C. albicans and C. parapsilosis* isolates submitted to concentrations of 1/2 MIC, MIC, and 2x MIC of punicalagin was not statistically significant, when compared to untreated yeasts (Fig. 2A and B).

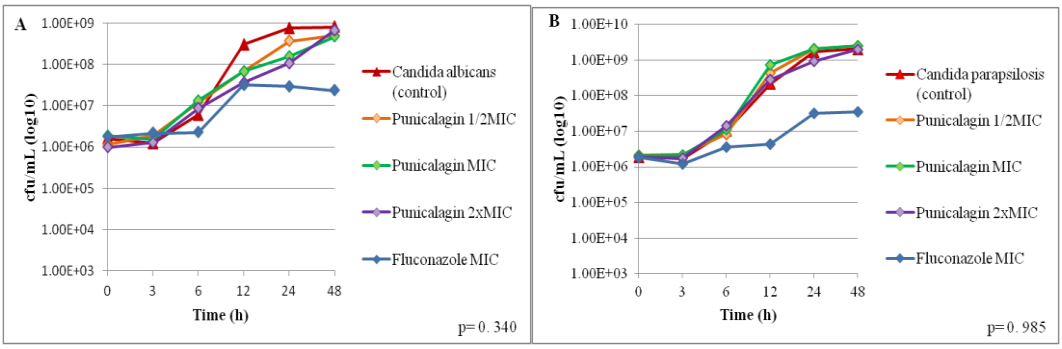

Fig. 2. Growth curve of *C. albicans* ATCC 90028 (A) and *C. parapsilosis* ATCC 22019 (B) treated with punicalagin at the values corresponding to 4 µg/mL (minimum inhibitory concentration), 2 µg/mL, and 8 µg/mL (A and B); and fluconazole at a concentration of 1 µg/mL (minimum inhibitory concentration) after 3, 6, 12, 24 and 48 hours of incubation (A and B).

3.3 Citotoxicity using Balb/C 3T3 cells and A 549 cells

The analysis of *in vitro* cytotoxicity using Balb/c 3T3 cells showed IC50 of 58.7 µg/mL for punicalagin and < 0.78 µg/mL for amphotericin B. Increased inhibition of 3T3 cell growth was observed with enhanced concentration of punicalagin as shown in Fig. 3A.

The methodology using the incorporation of MTT in alveolar epithelial cells showed that the concentration of punicalagin that caused the death of 50% of these cells was > 200 µg/mL, while for amphotericin B, used as a cytotoxicity control, the IC was 59.6 µg/mL. Effect of different concentrations of punicalagin after 48 hours exposure is shown in Fig. 3B.

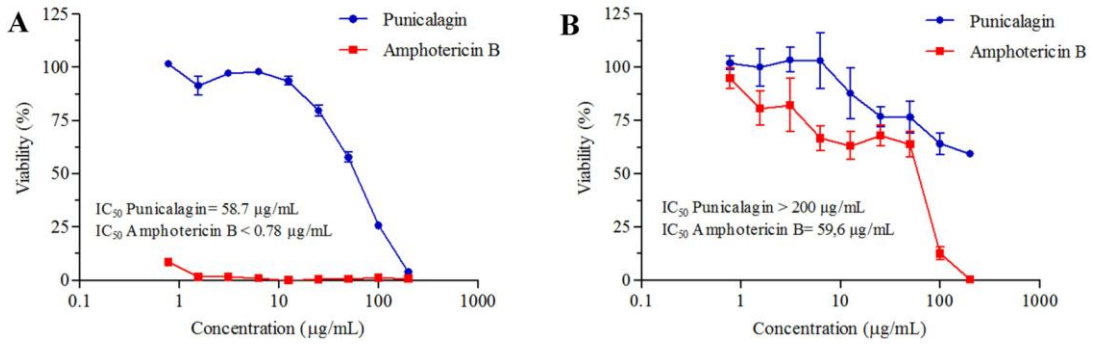

Fig. 3. A- Viability of Balb/c3T3 cells exposed with different concentrations of punicalagin and amphotericin B (both at 0.78-200 µg/mL) for 48 h using 3T3 neutral red uptake (NRU) assay. B- Cell viability curve of human alveolar epithelium A549 at different concentrations of punicalagin and amphotericin B (both at 0.78-200 µg/mL) for 48 h using MTT assay.

3.4 Citotoxicity in sheep erythrocytes

Results of cytotoxicity in sheep erythrocytes when exposed to punicalagin showed that concentration of 256 µg/mL produced hemolysis in 2.46% of these cells, while for amphotericin B, hemolysis of 0.87% erythrocyte cells was found with concentration of 8 µg/mL.

3.5 Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy analysis demonstrated that the untreated cells of *C. neoformans* species complex showed normal cell morphology with smooth wall and spherical bodies and were present in large amounts (Fig. 4 A and C). After exposure to punicalagin, the yeasts had rough walls and were shrivel as shown in Fig. 4 B and D.

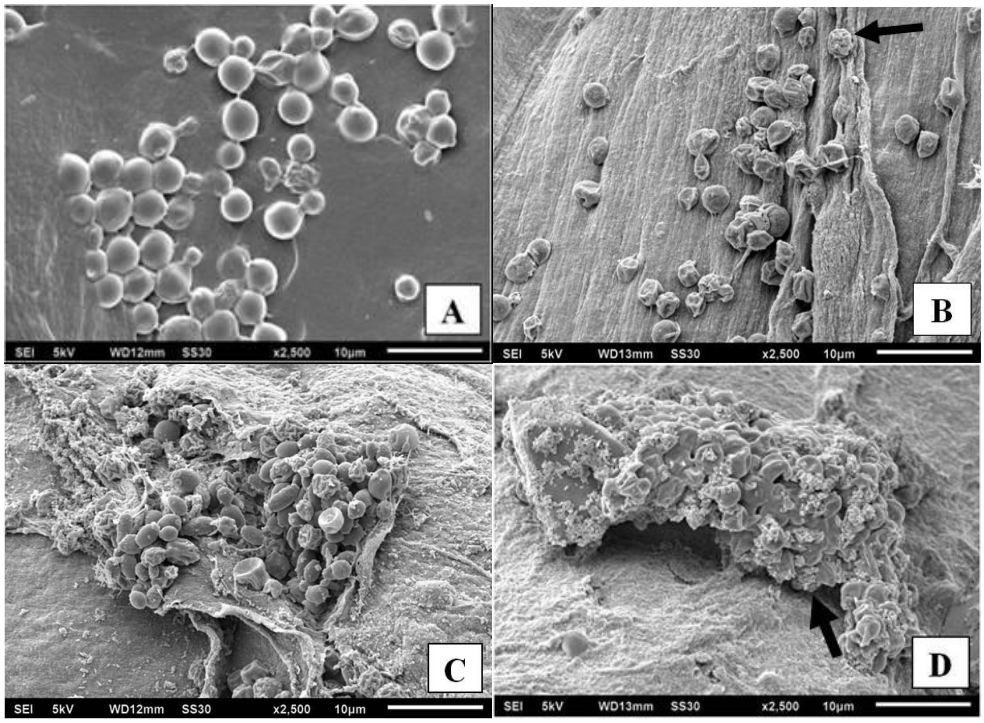

Fig. 4. Cell morphology analysis of *C. neoformans* ATCC 28957 and *C. gattii* 24065. Untreated cells appear ovoid and intact (A and C); and cells treated with punicalagin at minimum inhibitory concentration (4 µg/mL) show rough and shrivel yeasts (B and D).

Candida species treated with punicalagin presented structural and morphological alterations when compared to the control group. The cells of *Candida* species in the control group had smooth walls and a normal budding profile. A reduction in the number of cells and blastoconidia, with scar surfaces were found in the presence of punicalagin (Fig. 5).

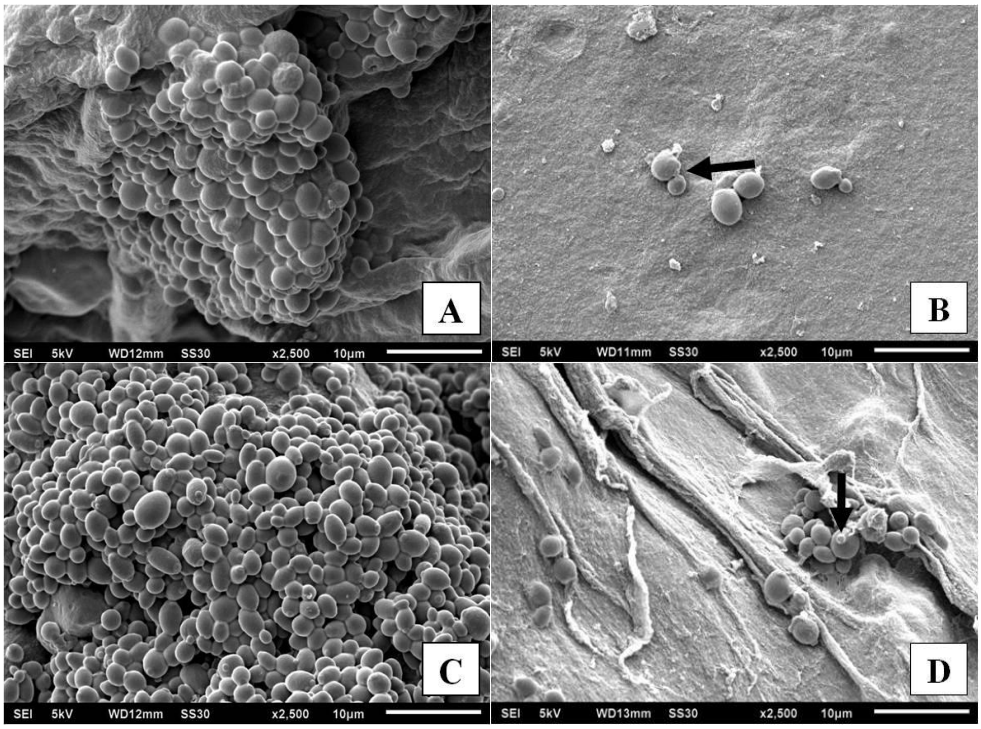

Fig. 5. Cell morphology analysis of *C. albicans* ATCC 90028 and *C.parapsilosis* ATCC 22019 by scanning electron microscopy. Untreated cells appear ovoid and smooth (A and C); Cells treated with punicalagin at the minimum inhibitory concentration of 4 µg/mL have reduced number cells and blastoconidia, and show scar surfaces (B and D).

4. Discussion

In recent years, various antifungal agents have been introduced for the prophylaxis and treatment of *Candida* species and *Cryptococcus neoformans* species complex [28]. Current pharmacological treatments are effective, but intrinsically resistant species are emerging rapidly. In addition, the high cost of treatment and host-associated cytotoxicity necessitate a direct search for new microbial compounds.

There is no consensus on the acceptable concentration that represents an antimicrobial activity for extracts, fractions, or compounds extracted from plants. A punctual analysis according to Holetz et al [29] demonstrated potential inhibitory antifungal activity of punicalagin against *Candida* species and *Cryptococcus neoformans* species complex.

The activity of punicalagin has been studied against some *Candida* species and against *C. neoformans* [4,30,6,7], but there are no reports described for *C. guilliermondii* and *C. gattii*. Interestingly, some isolates such as *C. gattii* L20 and C. *guilliermondii* 97 showed high MICs values to fluconazole, with low MIC values for punicalagin.

Fluconazole is the drug of choice for treating fungal infections, such as invasive candidiasis in humans. Although azoles have been used to treat of *Candida* sp. infections, numerous reports of treatment failures are described in the literature [31–33].

Moreover, our findings showed that punicalagin promotes fungistatic effects. CFM was >256 for all isolates and although kill curve showed reduction in the numbers of CFU of yeast cells, this difference was not statistically significant in treated and untreated cells for all yeasts studied. Our results are similar to those found by Endo et al. [6], who demonstrated a small reduction of CFU in the presence of punicalagin. Fungistatic effects of naturally occurring tannins against yeasts were reported by Baba-Moussa et al. [34] and Morey et al. [35].

Several researchers have used different types of cell lines to perform *in vitro* studies using punicalagin [6,36,37]. In this study, we found that punicalagin has low toxic activity on human lung carcinoma A549 cells, 3T3 fibroblast cells, and sheep erythrocytes.

The concentration of punicalagin with 50% cytotoxicity (IC50) on Balb/c 3T3 cells was 58.7 µg/mL, showing that this compound was 14.6 times greater than their MIC (4 µg/mL) against yeasts. Similar results were found with carcinoma cells, where IC50 was 200µg/mL, therefore, 50 times larger than MIC. Similar data to this study confirm the results of low *in vitro* toxicity observed for punicalagin. The low cytotoxic activity of punicalagin was verified by Endo et al. [6] on Vero and macrophages J774G8 cell monolayers and Foss et al. [5] on Vero cells.

We also demonstrated that punicalagin exhibited low toxicity on sheep erythrocytes cells. Lysis of sheep erythrocytes cells is easily obtained by measuring the release of hemoglobin, yielding a good tool for toxicity studies. Determination of hemolysis activity is quick, reproducible, and inexpensive [38].

The morphological changes seen in *Candida* sp treated with punicalagin are similar to Endo et al. [6] and Anibal et al. [4]. The reduced number of cells and blastoconidia, with scarred surfaces in the presence of punicalagin indicated that the compound caused serious damage to the cell structure. Similarly, the morphological alterations in treated *C. neoformans* showed damage in its cellular structure. These alterations could represent the first step towards the discovery of new drugs. Compounds that inhibit microbial growth and cause morphological changes can be suggested as potential antifungal agents.

Based on data obtained, we believe that punicalagin has antifungal potential on important pathogenic yeasts and presents low cytotoxicity profile associated with no hemolytic potential to animal cells. The excellence of punicalagin suggests that it may be a promising drug against the yeasts and invites further research.

Abbreviations

MIC, minimum inhibitory concentrations; MFC, Minimum fungicidal concentrations; Balb-c, Camundongos albinos da raça Balb-c; A549, human lung cancer cell line; ATCC, *American Type Culture Collection*; CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute; SDA, Sabouraud dextrose agar; RPMI, *Royal Park Memorial Institute*; DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*; HAM'S-F12, Ham's Nutrient Mixture F12 liquid; HEPES, N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico); EDTA, Ácido Etilenodiamino Tetra-acético; NRU, neutral red uptake; MTT, Brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio; DMSO, Dimetilsulfóxido; PBS, Phosphate Buffer Saline (Tampão Fosfato Salino); ANOVA, Análise de variância.

Conflits of interest

The authors declare no conflicts of interest

Acknowledgements

The authors would like to thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) by financial support, process 454660/2014-6.

Authors' contributions

TCS contributed with study design, acquisition, analysis and interpretation of the data, and drafting of the manuscript. ALdSAZ participated in the data interpretation, preparation, and writing of the manuscript. FAdS and RIdA contributed with acquisition, analysis, and interpretation of the data. MTFB, CRC, and MBV contributed with interpretation of the data and drafting of the manuscript. MRRS contributed with study design, interpretation of the data, and drafting of the manuscript. All authors have critically reviewed the intellectual content of the manuscript, approved the final version to be published, and declare that they are responsible for all aspects of the work in order to guarantee the accuracy and integrity of any part of the work.

References

[1] Tanaka T, Nonaka G, Nishioka I. Tannins and related compounds. XL: Revision of the structures of punicalin and punicalagin, and isolation and characterization of 2-O-galloylpunicalin from the bark of *Punica granatum* L. Chem Pharm Bull 1986;34:650–5.

[2] Yoshida T, Amakura Y, Yoshimura M. Structural features and biological properties of ellagitannins in some plant families of the order myrtales. Int J Mol Sci 2010;11:79–106. doi:10.3390/ijms11010079.

[3] Carneiro CC, da Costa SS, de Souza LR, Bara MTF, Chaibub BA, de Melo RPR, et al. Chemopreventive effect and angiogenic activity of punicalagin isolated from leaves of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. Toxicol Appl Pharmacol 2016;310:1–8. doi:10.1016/j.taap.2016.08.015.

[4] Anibal PC, Peixoto ITA, Foglio MA, Hofling JF. Antifungal activity of the ethanolic extracts of *Punica granatum* L. and evaluation of the morphological and structural modifications of its compounds upon the cells of *Candida* spp. Braz J Microbiol 2013;44:839–48. doi:10.1590/S1517-83822013005000060.

[5] Foss S, Nakamura C, Ueda-Nakamura T, Cortez D, Endo E, Dias Filho B. Antifungal activity of pomegranate peel extract and isolated compound punicalagin against dermatophytes. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2014;13:32. doi:10.1186/s12941-014-0032-6.

[6] Endo EH, Garcia Cortez DA, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Dias Filho BP. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. Res Microbiol 2010;161:534–40. doi:10.1016/j.resmic.2010.05.002.

[7] Reddy M, Gupta S, Jacob M, Khan S, Ferreira D. Antioxidant, Antimalarial and Antimicrobial Activities of Tannin-Rich Fractions, Ellagitannins and Phenolic Acids from *Punica granatum* L. Planta Med 2007;73:461–7. doi:10.1055/s-2007-967167.

[8] Enoch DA, Ludlam HA, Brown NM. Invasive fungal infections: A review of epidemiology and management options. J Med Microbiol 2006;55:809–18. doi:10.1099/jmm.0.46548-0.

[9] Maziarz EK, Perfect JR. Cryptococcosis. Infect Dis Clin North Am 2016;30:179–206. doi:10.1016/j.idc.2015.10.006.

[10] Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. Aids 2009;23:525–30. doi:10.1097/QAD.0b013e328322ffac.

[11] Chen SC-A, Slavin MA, Heath CH, Playford EG, Byth K, Marriott D, et al. Clinical Manifestations of *Cryptococcus gattii* Infection: Determinants of Neurological Sequelae and Death. Clin Infect Dis 2012;55:789–98. doi:10.1093/cid/cis529.

[12] Hagen F, Illnait-Zaragozi M-T, Bartlett KH, Swinne D, Geertsen E, Klaassen CHW, et al. *In vitro* Antifungal Susceptibilities and Amplified Fragment Length Polymorphism Genotyping of a Worldwide Collection of 350 Clinical, Veterinary, and Environmental *Cryptococcus gattii* Isolates. Antimicrob Agents Chemother 2010;54:5139–45. doi:10.1128/AAC.00746-10.

[13] Alfouzan W, Al-Sheridah S, Alenzi L, Hagen F, Meis JF, Khan Z. *Cryptococcus gattii* genotype AFLP6/VGII meningoencephalitis in an immunocompetent

Filipino male in Kuwait: activation of a dormant infection. JMM Case Reports 2015;2:1–6. doi:10.1099/jmmcr.0.000058.
[14] Larriba G, Coque JJR, Ciudad A, Andaluz E. *Candida albicans* molecular biology reaches its maturity. Int Microbiol 2000;3:247–52.
[15] Calderone RA. *Candida* and candidiasis. Washington DC: ASM Press; 2002.
[16] Colombo AL, Guimarães T, Sukienik T, Pasqualotto AC, Andreotti R, Queiroz-Telles F, et al. Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter studies sequentially conducted over a 9-year period. Intensive Care Med 2014;40:1489–98. doi:10.1007/s00134-014-3400-y.
[17] León C, Ostrosky-Zeichner L, Schuster M. What's new in the clinical and diagnostic management of invasive candidiasis in critically ill patients. Intensive Care Med 2014;40:808–19. doi:10.1007/s00134-014-3281-0.
[18] Xiao Y, Tang J, Guo H, Zhao Y, Tang R, Ouyang S, et al. Targeting CBLB as a potential therapeutic approach for disseminated candidiasis. Nat Med 2016;22:906–14.
[19] CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A3. Clin Lab Stand Inst 2008.
[20] CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. M27-S4. 2012.
[21] Klepser ME, Wolfe EJ, Jones RN, Nightingale CH. Antifungal Pharmacodynamic Characteristics of Fluconazole and Amphotericin B Tested against *Candida albicans*. Antimicrob AGENTS Chemother 1997;41:1392–5.
[22] Silva DC, Martins MA, Szeszs MW, Bonfietti LX, Matos D, Melhem MSC. Susceptibility to antifungal agents and genotypes of Brazilian clinical and environmental *Cryptococcus gattii* strains. Diagn Microbiol Infect Dis 2012;72:332–9. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2011.11.016.
[23] Borenfreund E, Puerner JA. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). J Tissue Cult Methods 1985;9:7–9. doi:10.1007/BF01666038.
[24] ICCVAM. Current status of *in vitro* test methods for identifying ocular corrosives and severe irritants: bovine corneal opacity and permeability test method 2006:06–4512.
[25] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983;65:55–63.
[26] He M, Du M, Fan M, Bian Z. *In vitro* activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. Mycopathologia 2007;163:137–43. doi:10.1007/s11046-007-0097-2.
[27] Faganello J, Arruda W, Schrank A, Vainstein MH. An alternative method to prepare samples of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans* for scanning electron microscopy analysis. J Microbiol Methods 2006;64:416–9. doi:10.1016/j.mimet.2005.07.003.
[28] Pianalto K, Alspaugh J. New horizons in antifungal therapy. J Fungi 2016;2:26. doi:10.3390/jof2040026.
[29] Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002;97:1027–31. doi:10.1590/S0074-02762002000700017.

[30] Liu M, Katerere DR, Gray AI, Seidel V. Phytochemical and antifungal studies on *Terminalia mollis* and *Terminalia brachystemma*. Fitoterapia 2009;80:369–73. doi:10.1016/j.fitote.2009.05.006.

[31] Sanglard D, Ischer F, Monod M, Bille J. Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. Microbiology 1997;143:405–16.

[32] Sanguinetti M, Posteraro B, Lass-Flörl C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. Mycoses 2015;58:2–13. doi:10.1111/myc.12330.

[33] Rossi SA, Trevijano-Contador N, Scorzoni L, Mesa-Arango AC, de Oliveira HC, Werther K, et al. Impact of resistance to fluconazole on virulence and morphological aspects of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates. Front Microbiol 2016;7. doi:10.3389/fmicb.2016.00153.

[34] Baba-Moussa F, Akpagana K, Bouchet P. Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine. J Ethnopharmacol 1999;66:335–8. doi:10.1016/S0378-8741(98)00184-6.

[35] T. Morey A, C. de Souza F, P. Santos J, A. Pereira C, D. Cardoso J, S.C. de Almeida R, et al. Antifungal Activity of Condensed Tannins from Stryphnodendron adstringens: Effect on *Candida* tropicalis Growth and Adhesion Properties. Curr Pharm Biotechnol 2016;17:365–75. doi:10.2174/1389201017666151223123712.

[36] Seidi K, Jahanban-Esfahlan R, Abasi M, Abbasi MM. Anti Tumoral Properties of *Punica granatum* (Pomegranate) Seed Extract in Different Human Cancer Cells. Asian Pacific J Cancer Prev 2016;17:1119–22. doi:10.7314/APJCP.2016.17.3.1119.

[37] Li Y, Yang F, Zheng W, Hu M, Wang J, Ma S, et al. *Punica granatum* (pomegranate) leaves extract induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway and inhibits migration and invasion in non-small cell lung cancer *in vitro*. Biomed Pharmacother 2016;80:227–35. doi:10.1016/j.biopha.2016.03.023.

[38] Mapfunde S, Sithole S, Mukanganyama S. *In vitro* toxicity determination of antifungal constituents from *Combretum zeyheri*. BMC Complement Altern Med 2016;16:162. doi:10.1186/s12906-016-1150-9.

Apêndice B- Antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and modify the cellular cycle

Thaísa Cristina Silva[1]; Ana Laura Sene Amâncio Zara[1]; Andressa Santana Santos[1], Fábio Ataídes[1], Viviane Aparecida[1]; Renato Ivan de Ávila[2], Carolina Rodrigues Costa[1], Marize Campos Valadares[2], Maria do Rosário Rodrigues Silva[1]

[1]Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

[2]Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular - FarmaTec, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

Correspondence: Thaísa Cristina Silva, Rua 235 esquina c/ 1ª Avenida, s/n°, 3° andar, Sala 426, Setor Universitário, Goiânia, Goiás, Brasil. CEP: 74605-050. E-mail: thaisa2011@hotmail.com. Contact number: +55-62-98186-3318.

Abstract

Background: Our previous experiments showed that punicalagin had excellent antifungal activity against the *C. neoformans* species complex and *C. albicans*. However there is little knowledge about mechanism of antifungal action of punicalagin against pathogenic yeasts.

Objectives: To evaluate the mechanism of antifungal action of punicalagin against *Cryptococcus neoformans* species complex and *Candida* sp.

Methods: The lesion in the plasma membrane was verified by inhibition methods of ergosterol synthesis and by flow cytometry. Ultrastructural alterations were studied by electronic transmission microscopy. Cell cycle and mitochondrial activite such as loss of membrane potential and production of reactive oxygen species (ROS) were analyzed by flow cytometry using specific fluorochromes.

Results: The punicalagin causes reduction in the amount of ergosterol of the cytoplasmic membrane of the yeasts. Some ultrastructural alterations like cell wall tickening and disorganization of the cytoplasmic content were observed. Cell cycle analysis of yeast treated with punicalagin demonstrates that it could accumulate the populations of cells in G0/G1 phase. The permeability of cytoplasmic membrane was

not altered. Accumulation of reactive oxygen species (ROS) and loss of cytoplasmic membrane potential were also not observed.

Conclusions: The antifungal activity of punicalgin resulted from its ability to alter the cell cycle of fungal cells and the reduction of ergosterol biosynthesis of the plasma membrane. This suggests that punicalagin is a plant-derived promising compound, and could be used to develop new antifungal.

Key words: Punicalagin. Antifungal activity. Ergosterol biosynthesis. Cell cycle. *Cryptococcus neoformans* species Complex. *Candida* sp.

1. Introduction

Fungal infections in imunompromised patients have substantially increased in number and severity over the past five decades. *Cryptococcus neoformans* species complex and *Candida* spp. have remained with as main yeast pathogens causing infections in these patients[1]. Cryptococcal meningitis is the more usual form of cryptococcose[2], being that *C. neoformans* e *C. gattii* are the major human pathogens causing these clinical infections[3]. Emergence of candidemia cases have been observed, with this infection becoming a severe problem in all over the world, causing a mortality rate around 50%[4–6]. Candidiasis is considered as the 4th most common nosocomial infection in the world and in Brasil was according to Doi et al. (2016)[7], the 7th most prevalent[4,6,8,9].

The notable increase in drug resistance and the undesirable effects caused by the existing antinfungal agents have greatly enhanced the interest to pursuit effective antimicrobial compounds[10,11].

In this scenario plants and their derivatives are known to be important in pharmacological research. New compounds from natural products provide a source of chemical scaffolds that have a variety of biological activities in the drug development[12]. Among the medicinal plants, *Lafoensia pacari* A. St.-Hil (Lythraceae), plant found in Brazilian Cerrado biome, stands out for presenting medicinal properties popularly known[13–15]. The punicalagina, a phenolic compound, extracted from *L. pacari* leaf, have shown proven biological activities[16–18]. Our experiments showed that punicalagin had excellent antifungal activity against the *C.*

neoformans species complex and *C. albicans* being able to inhibit the growth of these fungi in concentrations of 4 μg/mL (according to pessoal communication).

There is little knowledge about mechanism of antifungal action of punicalagin against pathogenic yeasts[10,19]. The cytoplasmic membrane, the cell cycle and the mitochondria were considered as possible targets of yeast cells for antifungal activity in the present study. So, mechanisms of action of the compound were studied using multiple ways. Cytoplasmic membrane injury, ergosterol content and cell ultrastructure changes were determined to verify the action of compound. The effect of punicalagin on markers of mitochondrial activity, such as loss of membrane potential and production of reactive oxygen species (ROS), were also investigated. Our study provided additional effort to the development of new antifungal therapy.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Amphotericin B, propidium iodide (IP), RNAse, acetate 2, 7-dichlorofluorescein (DCFH-DA) and rhodamine 123 were acquired from Sigma-Aldrich, (St. Louis, MO, USA). MitoTracker® Red CMXRos probe was purchased from Invitrogen (Grand Island, NY, USA).

2.2. Plant material

The punicalagin was extracted from leaves of *L. pacari* A. St.-Hil (Lythraceae) and characterized by HPLC/UV and ESI-TOF MS, 1D and 2D NMR spectroscopic evaluations as described by Carneiro et al. (2016)[20]. To carry out the assays, a stock solution of punicalagin was diluted in RPMI-1640 medium. The minimum inhibitory concentrations of punicalagin (MIC = 4μg/mL) in each isolate were previously obtained to conduct the assays.

2.3. Fungal strains

The yeast strains *C. neoformans* species complex, *C. albicans* and *C. parapsilosis* were used in this study.

2.4. Electron microscopy transmission

This assay was performed according to Brito, LINO-NETO; DOLDER (2009)[21]. *C. albicans* ATCC 90028 and *C. gattii* ATCC 24065 treated with punicalagin at concentration of 4 µg/mL for 48 and 72 h were fixed in 2.5% glutaraldehyde, diluted in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2 containing 0.2% picric acid, during 24 h at 4 °C. After two washes in cacodylate buffer for 10 min, the material was post-fixed in 1% osmium tetroxide for 2 h. Subsequently, the material was dehydrated in increasing concentrations of acetone and included in Epon resin. Ultrafine sections were stained with 2% uranyl acetate in distilled water and 0.2% lead citrate in a 1N sodium hydroxide solution. Ultrastructural analysis of the cuts was performed on Jeol transmission electron microscope, JEM-2100®, equipped with EDS, Thermo Scientific®.

2.5. Determination of ergosterol content in the plasma membrane

Total intracellular sterols were determined according to the method of Arthington-Skaggs et al. (1999)[22], with modifications. Inocula were prepared from a single colony of *C. gattii* ATCC 24065 and of *C. albicans* ATCC 90028. The yeasts were added of punicalagin at concentrations of 4 µg/mL (MIC) and 2 µg/mL (1/2 MIC). Controls were performed using fluconazole at concentrations of 8µg/mL and 1µg/mL in assay with *C. gatti* and C. *albicans* respectively. Samples were incubated for 48 h for *C. gattii* and 16 h for *C. albicans* under agitation of 200 rpm at 35 °C. Cells were harvested by centrifugation a 3700 rpm for 5 min and the net wet weight of the cell pellet was determined. An Aliquot of 3 mL of 25% alcoholic potassium hydroxide solution was added and incubated in a water bath at 85 °C during 4 h for *C. gattii* and during 1 h for *C. albicans*. Sterol was extracted with the addition of 1 mL of sterilized distilled water and 3 mL of n-heptane in each tube and the suspension was shaken for 3 min. The n-heptane layer was collected and diluted with ethanol and scanned spectrophotometrically between 240 to 300 nm (Cary®50 UV-Vis Varian). Ergosterol content was calculated as a percentage of the weight of the cell using the following equations:

% Ergosterol +% 24 (28)DHE = [($A_{281.5}$/290) x F]/ pellet weight

% 24(28) DHE = [A_{230}/518 x F]/ pellet weight

% Ergosterol = [%ergosterol - %24(28)DHE].

Where:

F= factor of dilution in ethanol (1:5), and 290 and 518 are the E values (in percentages per centimeter) as determined for crystalline ergosterol and 24 (28)DHE.

2.6. Evaluation of lesion of cytoplasmic membrane

Flow cytometry using fluorescent dye PI was used to investigate the effect of punicalagin on the integrity of fungal cells. Cells with damaged membrane internalize the PI, increasing red fluorescence[23]. Action of punicalagin on the cell membrane of *C. albicans* ATCC 90028 and *C. gattii* ATCC 24065 was assessed based on protocol described by Ahmad et al. (2011)[24], with some modifications. In brief, after treatment of cells (1 x 10^6 cells/mL) with punicalagin at 4 (MIC) or 16 µg/mL (4X MIC) for 2 h, cells were washed in PBS followed by resuspension with 100 µl of PBS containing propidium iodide (IP, 2 µg/mL). In parallel, cells groups treated with amphotericin B (2 µg/mL µg/mL) were also performed as positive controls. After incubation of 30 min at room temperature in the dark, cells were analyzed by BD FACSCanto II flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), through recording 10,000 events, and data analyzed using BD FACSDiva software (version 6.0). Cells stained with IP were considered with lesion of cytoplasmic membrane.

2.7. Cell cycle analysis

In order to elucidate the mechanisms of the grown inhibitory effects of punicalagin on yeasts, the cell cycle was determined. Cells (1 x 10^6 cells/mL) were treated with punicalagin (4 or 16 µg/mL) or amphotericin B (2 µg/mL) for 2 h. After that, cells were centrifuged at 5.000 rpm for 5 min, washed with 1 mL of ice-cold PBS and fixed with 1 mL of 70% ice-cold ethanol for overnight at 4 °C. After incubation, cells were centrifuged at 5.000 rpm for 5 min and washed twice with 1 mL of ice-cold PBS. Cells were then resuspended with 400 µL of solution containing RNAse (0.5 mg/mL). After incubation of 1 h at 37 °C, the cells were centrifuged at 5.000 rpm for 5 min and resuspended with 200 µL of PBS containing IP (5 µg/mL). After 15 min of incubation at room temperature, fluorescence intensity analysis of the PI–DNA complex was performed using a BD FACSCanto II flow cytometer.

2.8. Measurement of intracellular reactive oxygen species (ROS) production

ROS levels were determined using fluorescent probe DCFH-DA. Into cells, this dye is hydrolyzed by esterases, producing non-fluorescent substrate 2', 7'-dichlorofluorescine (DCFH), which is oxidized by intracellular ROS to 2', 7'-dichlorofluorescein (DCF), a highly fluorescent compound. The fluorescence intensity of the DCF is directly proportional to the ROS levels generated by cells [25]. Briefly, cells (1×10^3 - 1×10^6 cells/mL) were treated with punicalagin (4 or 16 µg/mL) or amphotericin B (2 µg/mL µg/mL) for 2, 6 and 24 h. Afterward, cells were centrifuged at 5.000 rpm for 5 min followed by resuspension with 300 µL of PBS containing DCFH-DA (10 µM). After 30 min of incubation at 35ºC, cells were then washed with PBS, resuspended with 200 µL of the same buffer and analyzed by a BD FACSCanto II flow cytometer.

2.9. Assessment of mitochondrial membrane potential (ΔΨm)

The effects of punicalagin in ΔΨm of *C. albicans* ATCC 90028 and *C. gattii* ATCC 24065 were investigated using rhodamine 123 dye. In brief, cells (1×10^6 cells/mL) were treated with punicalagin (4 or 16 µg/mL) or amphotericin B (2 µg/mL µg/mL) for 2 h. Posteriorly, cells were washed and incubated with PBS containing rhodamine 123 (10 µM) for 15 min at 35 °C. After that, cells were washed twice with PBS and resuspended with 200 µL of PBS to conduct flow cytometry analysis.

2.10. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 5.01 software for windows (GraphPad Inc., San Diego, CA). Data are expressed as mean ± standard deviation (SD) of three independent assays. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's posttest was used for inter group variation analysis. Statistical significance was established as $p<0.05$.

3. Results

3.1 Effect on ultrastructure of yeast

The effect of punicalagin on yeast ultrastructure revealed that untreated cells in the control group had normal and intact plasma membranes that were close to the cell wall, nucleus structure, cytoplasm and intact cell wall (Figure 1A and C). Cells treated of *C. gatti* ATCC 24065 showed disorganization of cytoplasmic content and complete loss of normal cell form (Figure 1B).

Yeast species of *C. albicans* ATCC 90028 showed thickened cell wall, alterations in the space between the cell wall and the plasma membrane, increase in the number and size of the vacuoles, and disorganization of the cytoplasmic content (Figure 1 D).

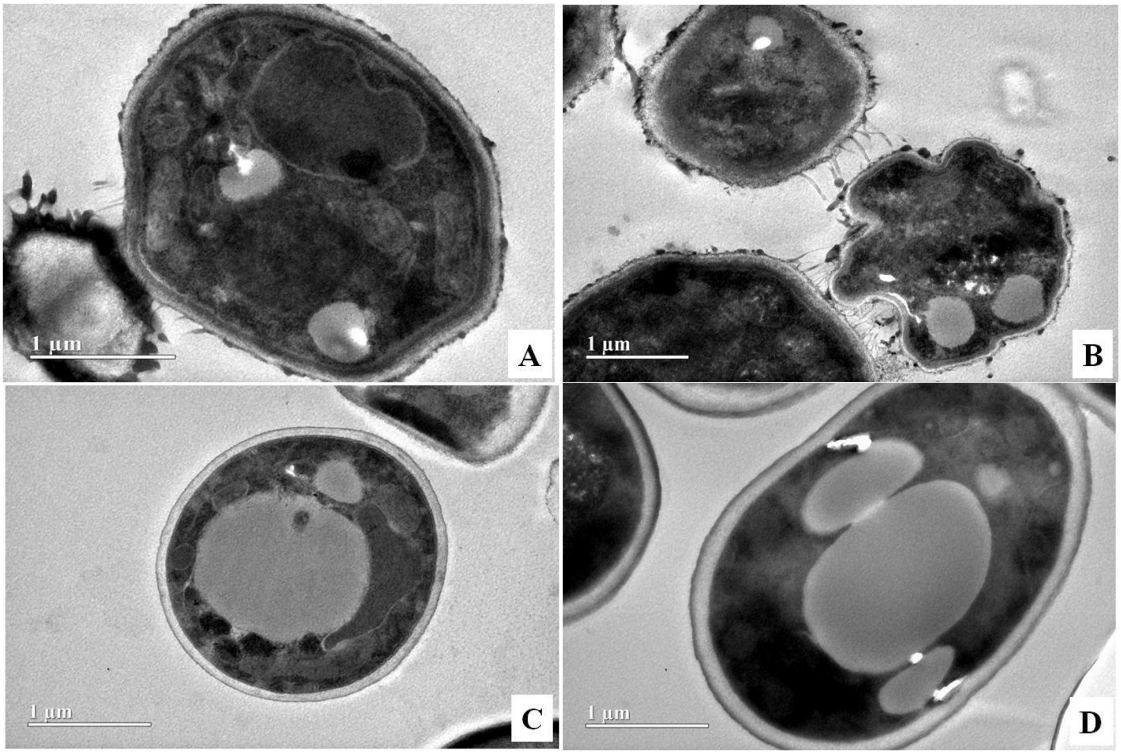

Figura 1 - Transmisson electron microscopy of *C. gatti* ATCC 24065 and *C. albicans* ATCC 90028. A - Cells of *C. gattii* untreated;. B - Cells *C. gattii* treated with 4 µg/mL punicalagin; C cells of *C. albicans* untreated; D - Cells *C. albicans* treated with 4 µg/mL of punicalagin**.**

3.2 Effect of punicalagin on plasma membrane ergosterol content

In the cells of *C. gattii* ATCC 24065 submitted to the action of punicalagin in the MIC (4 µg/mL), there was a reduction of 34.08% of ergosterol compared to the growth without punicalagin/control, whereas in the ½ MIC (2 µg/mL) the reduction was 18.8% (Figure 2A). For *C. albicans* ATCC 90028 a reduction of 7.88 % of the

ergosterol content in the plasma membrane compared with the control was observed at 4 μg/mL and of 3.66 % at 2 μg/mL of punicalagin (Figure 2B). It was observed that increasing concentrations of punicalagin increased the inhibition of percentage ergosterol.

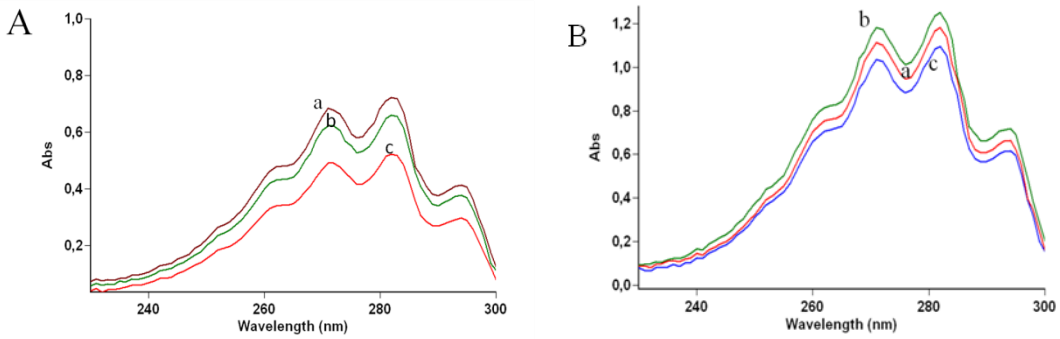

Figure 2 - Reduction of ergosterol synthesis in the membrane in *C. gattii* ATCC 24065 (A) and *C. albicans* ATCC 90028 (B) in presence of punicalagin. (Figure A and B) Profile of sterols analyzed by UV spectrophotometry (230-300nm) of untreated/control 0 μg/mL (a), in the presence of punicalagin at concentrations of ½ MIC 2 μg/mL (b) and in MIC 4 μg/mL (c)

3.3 Effect of punicalagin on lesion of cytoplasmic membrane

The penetration of PI into yeast cells untreated and treated with different concentrations of punicalagin is shown in Figure 3. Our results showed that punicalagin was not able to cause damage to the cell membrane of *C. gattii* ATCC 24065 and *C. albicans* ATCC 90028 at MIC and at 4X MIC (Figures 3 and 4). Punicalagin presented a percentage of non-viable cells by membrane injury significantly lower than amphotericin B ($p < 0.0001$) (Figure 4). This result suggests that punicalagin does not affect cell membrane permeability.

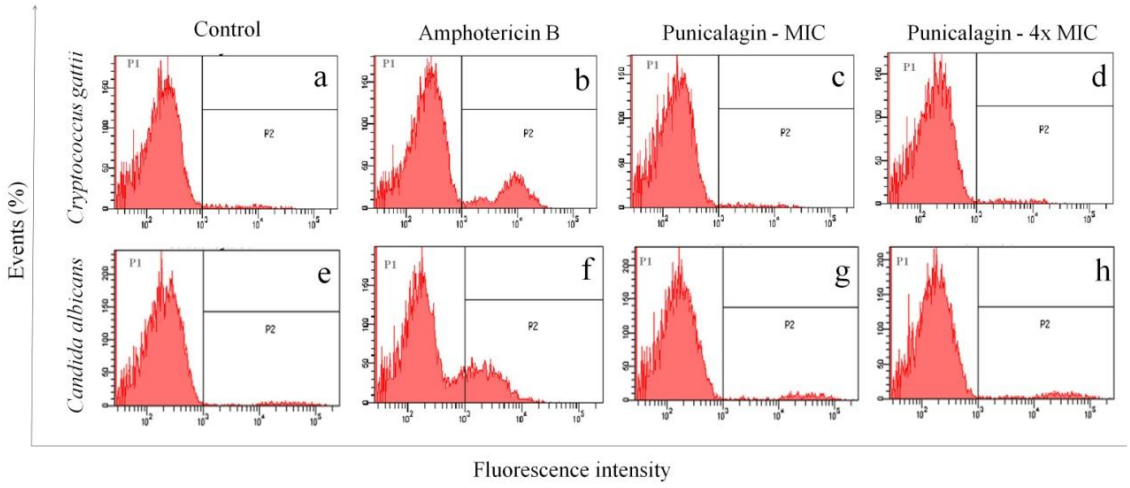

Figura 3: Density plots showing *Cryptococcus gattii* ATCC 24065 and *Candida albicans* ATCC 90028 analyzed by flow cytometry treated with punicalagin. a e e) untreated control cells; b e f) cells treated with amphotericin B; c e g) treated with 4µg/mL of punicalagin and d e h) treated with 16 µg/mL of punicalagin.

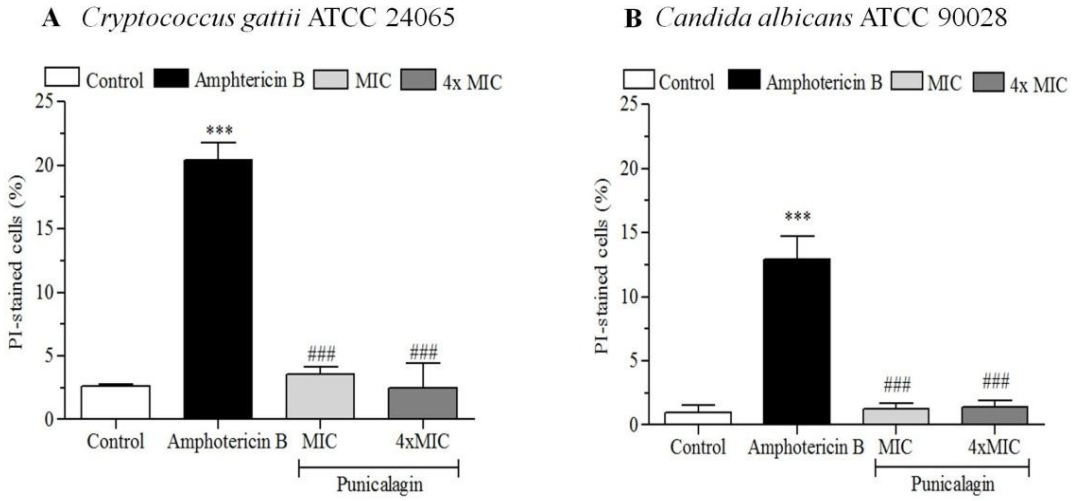

Figura 4: Percentage of cells PI-stained analyzed by flow cytometry. Cells treated with punicalagin at MIC (4µg/mL) and at 4xMIC (16 µg/mL), and with amphotericin B (1 µg/mL), over a period of 30 min

Note: $^{***}p<0.0001$ vs. control; $^{###}p<0.0001$ vs. amphotericin B.

3.4 Effects of punicalagin on cell cycle

Cell cycle phases analyzed in the presence of punicalagin revealed two peaks, the first corresponding to the G0/G1 phase of the cell cycle (growth and formation of blastoconidia), the second peak corresponding to the G2/M phase (cell division). S phase, which corresponded to the area between the two peaks was visualized and showed at Figure 5.

The results demonstrated that punicalagin treatments of yeasts for 24h could accumulate the populations of cells in G0/G1 phase compared to control cells ($p<0.001$). These results indicated that punicalagin might induce G0/G1 arrest of cells with a dobse-dependent manner. The reduction ratio of fungal cells treated with punicalagin in 4x MIC (16 µg/mL) and amphotericin B (2µg/mL) for the cells of *C. gattii* 24065 and *C. albicans* ATCC 90028 at the G2/M phase was significantly lower than the percentage of control cells (Figure 6).

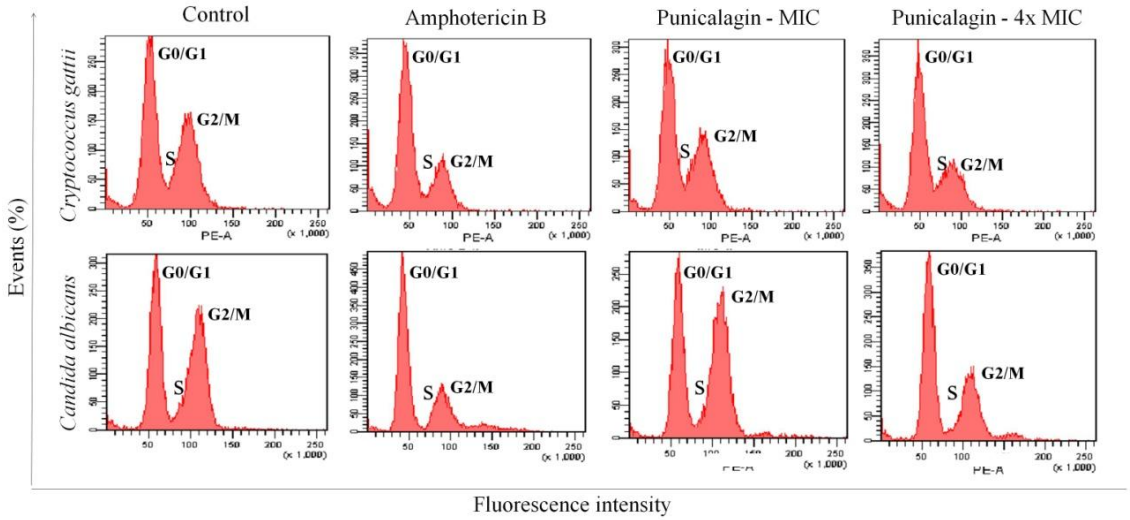

Figure 5: Cell cycle distribution of *C. gattii* cells ATCC 24065 and *C.albicans* ATCC 90028 by flow cytometry after exposure to punicalagin for 24 h.

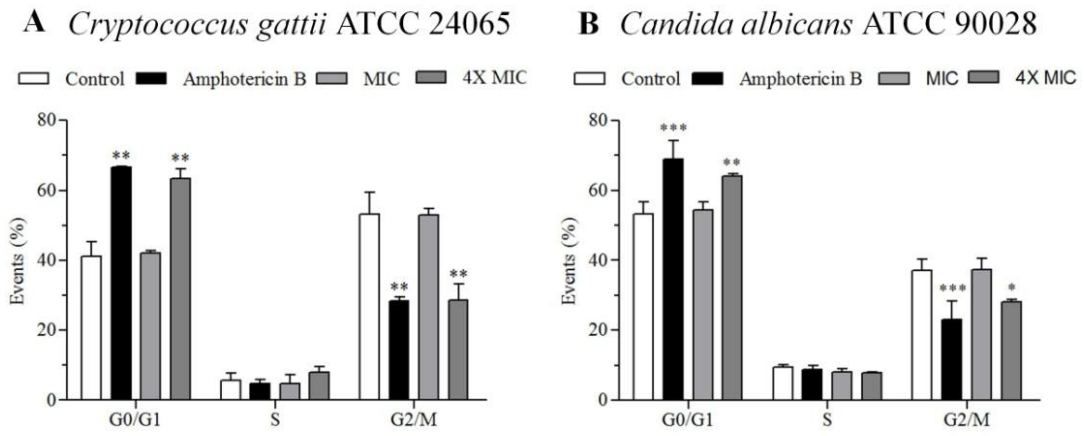

Figure 6: Cell cycle analysis of *C. gattii* ATCC 24065 (A) and *C. albicans* ATCC 90028 (B) untreated and treated with punicalagin in MIC (4 µg/mL), and 4x MIC (16 µg/mL), and amphotericin B (2µg/mL) after 24 hours of incubation

Note: $^{*}p<0.05$; $^{**}p<0.001$; $^{***}p<0,0001$ vs. control

3.5 Effect of punicalagin on ROS formation

DCFH-DA fluorescent dye was used to investigate changes in the intracellular ROS level of cells. The increase in fluorescence intensity was not detected in cells of *C.*

neoformans ATCC 24065 and *C. albicans* ATCC 90028 incubated with different concentrations of punicalagin for 24 hours. The production of ROS in *C. gattii* ATCC 24065 ($p<0.001$) and *C. albicans* ATTC 90028 ($p<0.0001$) cells treated with punicalagin was significantly lower than the ROS production produced by amphotericin B treated cells. Compared to control, cells exposed to punicalagin did not induce a significant increase in ROS production. While the samples treated with amphotericin B, there was a significant number of cells ($p<0.0001$) that showed accumulation of free radicals (Figure 7).

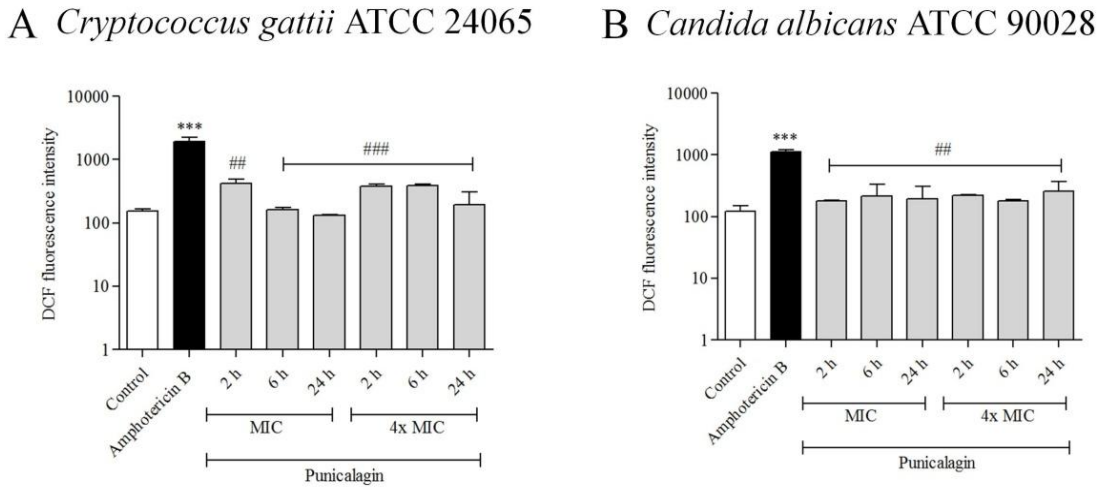

Figure 7: Effect of punicalagin on the production of ROS in *C. neoformans* ATCC 24065 and *C. albicans* ATCC 90028 determined by flow cytometry
Note: $^{***}p<0,0001$ vs. control; $^{###}p<0,0001$ e $^{##}p<0,001$ vs. amphotericin B

3.6 Effect of punicalagin on the mitochondrial membrane potential (ΔΨm)

To identify wether punicalagin induces rupture of mitochondrial membrane potential ΔΨm, we use a mitochondria specific dye R123, which are fluorescent and accumulate in the mitochondria, depending on their membrane potential.

The cells of *C. gattii* ATCC 24065 treated with concentration punicalagin (4x MIC) showed a significant loss of ΔΨm in relation to the control ($p<0.05$). On the other hand, *C. albicans* ATCC 90028 cells treated with punicalagin showed no significant loss of ΔΨm in relation to control. Cells treated with amphotericin B (2 μg/mL) compared to control showed a significant reduction of mitochondrial membrane potential ($p<0.0001$) (Figure 8).

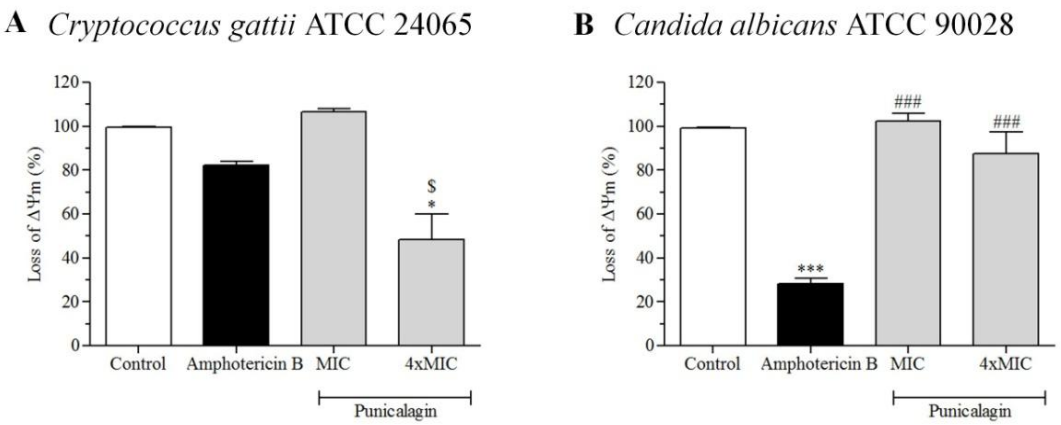

Figure 8: Mitochondrial membrane potential ΔΨm, analyzed by the addition of rhodamine 123. *C. gattii* ATCC 24065 (A) and *C. albicans* ATCC 90028 (B) cells treated with amphotericin B (2 μg/mL) and punicalagin MIC (4 μg/mL) and 4x MIC (16 μg/mL)

Note: $^{*}p < 0.05$, $^{***}p < 0.0001$ vs. control; $^{###}p < 0.0001$ vs. amphotericin B; $^{\$}p < 0.05$ vs. MIC

4. Discussion

A high antifungal activity of elagitannin punicalagin on pathogenic yeasts, especially those of the *Cryptococcus neoformans* complex and the *Candida* genus was observed in our early works, indicating this substance as a potent antimycotic agent, without, however, elucidating the mechanism of action of this compound.

Identifying and validating molecular targets represent the first step in finding new drugs. With increasing technological development, it became possible to identify key enzymes, receptors, and blockers from action targets in the fungal cell[26].

In this way, the first step in understanding what happened in the cell was to check the behavior in ultramicroscopy since there are few reports of the ultrastructural effect of punicalagin on fungal cells. The data obtained by transmission electron microscopy showed that the yeasts underwent morphological changes when treated with punicalagin. These alterations involved membrane and cytoplasmic content.

Given these results we chose to study the cytoplasmic membrane and the cellular analysis by flow cytometry which allows the knowledge of the possible mechanism of action of each antifungal as interference in the cell cycle, injury of the plasma membrane of the fungus or mitochondrial alterations under the action of the compound.

Vasconcelos et al. (2003)[27] attributed to tannins the ability to inhibit the growth of yeast due to their action on the cell, specifically on the cell membrane. The mechanism of primary action of azole antifungals occurs by inhibition of the enzyme

14-alpha demethylase lanosterol, inhibiting the synthesis of ergosterol, the main sterol component of the fungal cell membrane [28]. Ergosterol, maintains cellular function and integrity[29]. According to several researchers, products extracted from plants can cause a considerable reduction in the amount of ergosterol[30–32]; Zorick et al (2016)[30] demonstrated that the phenolic compound, oleuropein at the highest concentration studied (1.25 mg/mL^{-1}) caused a 28% reduction in the total membrane sterol content of *C. albicans*. However, this work represents the first attempt to unveil the possible mechanism of action of punicalagin, evaluating its effect on sterol biosynthesis. In this work, punicalagin inhibited the ergosterol synthesis of the cytoplasmic membrane of *C. gattii* and *C. albicans*.

By flow cytometry a possible mechanism of action was the inhibition of the development of the fungus by its action in the cell cycle. This is the first paper to demonstrate the mechanism of action of punicalagin using this methodology.

Punicalagin has an antifungal potential against important pathogenic yeasts. The excellence of punicalagina makes this compound promising for the treatment of fungal infections caused by yeast.

5. Conclusion

The results obtained showed that the antifungal activity of punicalgin is related from its ability to alter the cell cycle of fungal cells and the reduction of ergosterol biosynthesis of the plasma membrane. This suggests that punicalagin is a plant-derived promising compound, and could be used to develop new antifungal.

6. Reference

[1] Pfaller MA, Diekemaa DJ. Epidemiology of invasive mycoses in North America. Crit Rev Microbiol 2010;36:1–53.

[2] Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. Aids 2009;23:525–30. doi:10.1097/QAD.0b013e328322ffac.

[3] Maziarz EK, Perfect JR. Cryptococcosis. Infect Dis Clin North Am 2016;30:179–206. doi:10.1016/j.idc.2015.10.006.

[4] Colombo AL, Guimarães T, Sukienik T, Pasqualotto AC, Andreotti R, Queiroz-Telles F, et al. Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter studies sequentially conducted over a 9-year period. Intensive Care Med 2014;40:1489–98. doi:10.1007/s00134-014-3400-y.

[5] Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, et al. Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care–Associated Infections. N Engl J Med 2014;370:1198–208. doi:10.1056/NEJMoa1306801.

[6] Bassetti M, Righi E, Ansaldi F, Merelli M, Trucchi C, Cecilia T, et al. A multicenter study of septic shock due to candidemia: outcomes and predictors of mortality. Intensive Care Med 2014;40:839–45. doi:10.1007/s00134-014-3310-z.

[7] Doi AM, Pignatari ACC, Edmond MB, Marra AR, Camargo LFA, Siqueira RA, et al. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. PLoS One 2016;11:e0146909. doi:10.1371/journal.pone.0146909.

[8] Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. Clin Microbiol Rev 2007;20:133–63. doi:10.1128/CMR.00029-06.

[9] Lortholary O, Renaudat C, Sitbon K, Madec Y, Denoeud-Ndam L, Wolff M, et al. Worrisome trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002-2010). Intensive Care Med 2014;40:1303–12. doi:10.1007/s00134-014-3408-3.

[10] Anibal PC, Peixoto ITA, Foglio MA, Hofling JF. Antifungal activity of the ethanolic extracts of *Punica granatum* L. and evaluation of the morphological and structural modifications of its compounds upon the cells of *Candida* spp. Braz J Microbiol 2013;44:839–48. doi:10.1590/S1517-83822013005000060.

[11] Xiao Y, Tang J, Guo H, Zhao Y, Tang R, Ouyang S, et al. Targeting CBLB as a potential therapeutic approach for disseminated candidiasis. Nat Med 2016;22:906–14.

[12] Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. Food Chem Toxicol 2008;46:446–75. doi:10.1016/j.fct.2007.09.106.

[13] Lima MF, Ximenes ECPA, Luna JS, Goulart AE. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. Rev Bras Farmacogn 2006;16:300–6.

[14] Müller V, Chávez JH, Reginatto FH, Zucolotto SM, Niero R, Navarro D, et al. Evaluation of antiviral activity of South American plant extracts against herpes simplex virus type 1 and rabies virus. Phyther Res 2007;21:970–4.

[15] Guimarães HA, Nascimento MVM, Tavares A, Galdino PM, Paula JR De, Costa EA. Effects of ethanolic extract of leaves of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae (pacari), in pain and inflammation models. Rev Bras Farmacogn 2010;20:328–33. doi:10.1590/S0102-695X2010000300007.

[16] Reddy BU, Mullick R, Kumar A, Sudha G, Srinivasan N, Das S. Small molecule inhibitors of HCV replication from pomegranate. Sci Rep 2014;4:5411. doi:10.1038/srep05411.
[17] Foss S, Nakamura C, Ueda-Nakamura T, Cortez D, Endo E, Dias Filho B. Antifungal activity of pomegranate peel extract and isolated compound punicalagin against dermatophytes. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2014;13:32. doi:10.1186/s12941-014-0032-6.
[18] Howell AB, Souza DHD. The pomegranate : effects on bacteria and viruses that influence human health effects on human bacteria bacteria that affect the human body. Evidence-Based Complement Altern Med 2013;2013.
[19] Endo EH, Garcia Cortez DA, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Dias Filho BP. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. Res Microbiol 2010;161:534–40. doi:10.1016/j.resmic.2010.05.002.
[20] Carneiro CC, da Costa Santos S, de Souza Lino R, Bara MTF, Chaibub BA, de Melo Reis PR, et al. Chemopreventive effect and angiogenic activity of punicalagin isolated from leaves of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. Toxicol Appl Pharmacol 2016;310:1–8. doi:10.1016/j.taap.2016.08.015.
[21] Brito P, Lino-Neto J, Dolder H. Sperm structure and ultrastructure of the *Melittobia hawaiiensis*, Perkins and *M. australica*, Girault (Chalcidoidea: Eulophidae). Tissue Cell 2009;41:113–7. doi:10.1016/j.tice.2008.08.002.
[22] Arthington-Skaggs BA, Jradi H, Desai T, Morrison CJ. Quantitation of ergosterol content: Novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans*. J Clin Microbiol 1999;37:3332–7.
[23] Pina-Vaz C, Sansonetty F, Rodrigues AG, Costa-Oliveira S, Tavares C, Martinez-De-Oliveira J. Cytometric approach for a rapid evaluation of susceptibility of *Candida* strains to antifungals. Clin Microbiol Infect 2001;7:609–18. doi:10.1046/j.1198-743X.2001.00307.x.
[24] Ahmad A, Khan A, Akhtar F, Yousuf S, Xess I, Khan LA, et al. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2011;30:41–50. doi:10.1007/s10096-010-1050-8.
[25] Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. Am J Physiol Cell Mol 2000;279:L1005-28.
[26] Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. Nat Rev Drug Discov 2004;3:935–49. doi:10.1038/nrd1549.
[27] Vasconcelos LCDS, Sampaio MCC, Sampaio FC, Higino JS. Use of Punica granatum as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis. Mycoses 2003;46:192–6.
[28] Kelly SL, Lamb DC, Corran AJ, Baldwin BC, Kelly DE. Mode of Action and Resistance to Azole Antifungals Associated with the Formation of 14α-Methylergosta-8,24(28)-dien-3β,6α-diol. Biochem Biophys Res Commun 1995;207:910–5. doi:10.1006/bbrc.1995.1272.
[29] Rodriguez RJ, Low C, Bottema CD, Parks LW. Multiple functions for sterols in Saccharomyces cerevisiae. Biochim Biophys Acta 1985;837:336–43.
[30] Zorić N, Kopjar N, Bobnjarić I, Horvat I, Tomić S, Kosalec I. Antifungal Activity of Oleuropein against *Candida albicans*—The *In vitro* Study. Molecules 2016;21:1631. doi:10.3390/molecules21121631.

[31] Reis MPC, Carvalho CRC, Andrade FA, Fernandes OFL, Arruda W, Silva MRR. Fisetin as a promising antifungal agent against Cryptococococcus neoformans species complex. J Appl Microbiol 2016;121:373–9. doi:10.1111/jam.13155.

[32] Tian J, Ban X, Zeng H, He J, Chen Y, Wang Y. The Mechanism of Antifungal Action of Essential Oil from Dill (*Anethum graveolens* L.) on Aspergillus flavus. PLoS One 2012;7:e30147. doi:10.1371/journal.pone.0030147.