

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ESPILANTOL CONTRA LEVEDURAS DOS
COMPLEXOS DE ESPÉCIES *Cryptococcus***

RENATA PEREIRA COSTA

PORTO ALEGRE, 2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

Renata Pereira Costa

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ESPILANTOL CONTRA LEVEDURAS DOS
COMPLEXOS DE ESPÉCIES *Cryptococcus***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Farmácia da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
como requisito à obtenção do título de grau
de Farmacêutico.

Orientador: Profa. Dr. Lucélia Santi

Coorientador: Msc. Yohana Porto Calegari Alves

Porto Alegre, 2024

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| LISTA DE FIGURAS..... | 5 |
| LISTA DE TABELAS..... | 6 |
| RESUMO..... | 7 |
| ABSTRACT..... | 8 |
| 1. Introdução..... | 9 |
| 2. Objetivos..... | 11 |
| 2.1 Objetivos gerais..... | 11 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 11 |
| 3. Revisão da literatura..... | 12 |
| 3.1 <i>Cryptococcus</i> sp..... | 12 |
| 3.1.1 Fatores de virulência..... | 13 |
| 3.2 Tratamentos antifúngicos para criptococose..... | 15 |
| 3.3 Biodiversidade como fonte de moléculas..... | 17 |
| 4. Materiais e métodos..... | 20 |
| 4.1 Manutenção e cultivo dos microrganismos..... | 20 |
| 4.2 Material vegetal..... | 20 |
| 4.2.1 Produção do extrato hexânico..... | 20 |
| 4.2.2. Isolamento da molécula..... | 20 |
| 4.3 Concentração inibitória mínima (CIM)..... | 20 |
| 4.4 Avaliação do mecanismo de ação..... | 20 |
| 4.4.1 Extravasamento intracelular..... | 21 |
| 4.4.2 Quantificação de ergosterol..... | 21 |
| 4.4.3 Quantificação de EROs..... | 21 |
| 4.4.4 Quantificação de cápsula polissacarídica..... | 22 |
| 4.4.5 Ensaio de urease..... | 22 |
| 4.4.6 Análises estatísticas..... | 22 |
| 5. Resultados e discussão..... | 23 |
| 5.1 Concentração Inibitória Mínima..... | 23 |

| | |
|--|----|
| 5.2 Espilantol causa alteração na membrana celular..... | 24 |
| 5.3 Aumento de espécies reativas de oxigênio causado pelo espilantol..... | 26 |
| 5.4 Efeito do espilantol sobre a cápsula polissacarídica..... | 28 |
| 5.5 Espilantol causa diminuição da atividade de urease..... | 29 |
| 6. Conclusão..... | 32 |
| REFERÊNCIAS..... | 33 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - <i>Acmella oleracea</i> (L.) R.K. Jansen (Asteraceae)..... | 18 |
| Figura 2 - Estrutura molecular do espilantol..... | 19 |
| Figura 3 - Atividade de espilantol sobre o ergosterol de <i>C. neoformans</i> H99..... | 25 |
| Figura 4 - Avaliação do extravasamento intracelular ocasionado pelo espilantol sobre <i>C. neoformans</i> H99..... | 26 |
| Figura 5 - Porcentagem de espécies reativas de oxigênio (EROs) em <i>C. neoformans</i> H99 sob tratamento com espilantol e peróxido de hidrogênio..... | 27 |
| Figura 6 - Atividade de espilantol sobre a cápsula polissacarídica de <i>C. neoformans</i> H99..... | 28 |
| Figura 7 - Efeito do espilantol sobre a atividade de urease de <i>C. neoformans</i> H99 em diferentes tempos..... | 30 |
| Figura 8 - Elucidação do mecanismo de ação do espilantol contra <i>C. neoformans</i> | 31 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Concentração inibitória mínima (CIM) da molécula natural espilantol contra leveduras do gênero <i>Cryptococcus</i> sp..... | 23 |
|--|----|

RESUMO

Cryptococcus gattii e *Cryptococcus neoformans* são os agentes etiológicos da criptococose, doença sistêmica que provoca pneumonia e meningite. Apesar da alta taxa de mortalidade, os tratamentos disponíveis apresentam toxicidade e podem levar ao desenvolvimento de resistência fúngica. Portanto, a busca por novas moléculas antifúngicas se faz necessária. Diante da biodiversidade vegetal brasileira, o presente trabalho propôs avaliar a atividade antifúngica de uma molécula natural isolada, o espilantol, contra isolados de *C. deuterogattii*, *C. neoformans* e *C. deneoformans*. O espilantol foi isolado a partir de um extrato hexânico de folhas de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Asteraceae) e sua concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição. A molécula apresentou CIM de 0,5 mg/mL para os isolados *C. neoformans* H99 e *C. deuterogattii* R265 e R272, e CIM de 0,25 mg/mL para *C. deneoformans* B3501. Ensaio para investigação do mecanismo de ação da molécula foram realizados contra o isolado *C. neoformans* H99: cápsula polissacarídica, extravasamento intracelular, urease, ergosterol e espécies reativas de oxigênio. Observou-se que o espilantol causa extravasamento do material intracelular, além de alterar o conteúdo de ergosterol da membrana plasmática. Além disso, a molécula levou a uma diminuição da atividade de urease, um importante fator de virulência de *C. neoformans*. Da mesma forma, foi observado que o espilantol causa um aumento da quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO) e aumento de área capsular. Diante dos resultados, podemos concluir que o espilantol provavelmente leva a uma alteração na parede celular, causando possíveis poros na membrana plasmática devido a peroxidação lipídica gerada pelo aumento de EROs, bem como diminui a atividade de urease e leva ao aumento da cápsula polissacarídica. Assim, além de apresentar atividade antifúngica, o espilantol apresenta atividade antivirulência, o que é de grande interesse, uma vez que diminui o surgimento de resistência antimicrobiana, um dos maiores problemas de saúde pública atual.

Palavras-chave: *Cryptococcus*; *Cryptococcus neoformans*; espilantol; extrato vegetal; molécula natural.

ABSTRACT

Cryptococcus gattii and *Cryptococcus neoformans* are the etiological agents of cryptococcosis, a systemic disease that causes pneumonia and meningitis. Despite the high mortality rate, available treatments are toxic and can lead to the development of fungal resistance. Therefore, the search for new antifungal molecules is necessary. In the face of Brazilian plant biodiversity, this study aimed to evaluate the antifungal activity of a natural molecule, spilanthol, against isolates of *C. deuterogattii*, *C. neoformans* and *C. deneoformans*. Spilanthol was isolated from a hexane extract of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen leaves (Asteraceae), and its minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the microdilution method. The molecule showed an MIC of 0.5 mg/mL for isolates *C. neoformans* H99 and *C. deuterogattii* R265 and R272, and an MIC of 0.25 mg/mL for *C. deneoformans* B3501. Assays to investigate the molecule's mechanism of action were performed against the *C. neoformans* H99 isolate, including polysaccharide capsule, intracellular leakage, urease, ergosterol, and reactive oxygen species (ROS). It was observed that spilanthol caused intracellular material leakage, altered the ergosterol content of the plasma membrane, and decreased urease activity, a crucial virulence factor of *C. neoformans*. Additionally, spilanthol led to an increase in reactive oxygen species (ROS) and capsule area. Based on the results, it can be concluded that spilanthol likely induces alterations in the cell wall, possibly causing pores in the plasma membrane due to lipid peroxidation generated by increased ROS. Moreover, it decreases urease activity and increases the polysaccharide capsule. Therefore, in addition to presenting antifungal activity, spilanthol exhibits antivirulence activity, which is of great interest as it reduces the emergence of antimicrobial resistance, a major public health concern today.

Keywords: *Cryptococcus*; *Cryptococcus neoformans*; spilanthol; plant extract; natural molecule

1. Introdução

A criptococose é uma infecção sistêmica causada por leveduras dos complexos de espécies *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans*. Essas espécies são comumente encontradas no solo e em associação com árvores, madeiras em decomposição e em excrementos de pombos (MAY *et al.*, 2016). A inalação de células secas da levedura ou esporos encontrados no ambiente dá início à infecção pulmonar, que pode permanecer latente por extensos períodos. No entanto, grande parte dos casos progride para disseminação hematogênica, chegando ao SNC e causando a meningite criptocócica, responsável por 223.100 casos/ano e mais de 80% de mortalidade (SHOURIAN; QURESHI, 2019; SPADARI *et al.*, 2020; WILLIAMSON *et al.*, 2017). A doença sistêmica causada por *C. neoformans* ocorre principalmente em pacientes imunossuprimidos, sendo a segunda causa de morte entre pacientes que convivem com o HIV (SHOURIAN; QURESHI, 2019). Entretanto, a criptococose também ocorre em indivíduos aparentemente saudáveis, cujo os agentes etiológicos são as espécies do complexo *C. gattii* (FRANCO-PAREDES *et al.*, 2015). Isolados de *Cryptococcus deuterogattii* e *C. gattii* foram responsáveis por um surto em Vancouver, Canadá, em 1999, espalhando-se para os Estados Unidos (KIDD *et al.*, 2004). No Norte do Brasil, *Cryptococcus bacillisporus*, que pertence ao complexo *C. gattii*, é considerado endêmico e afeta principalmente crianças e jovens (DOS SANTOS BENTES *et al.*, 2019; MARTINS *et al.*, 2011; SEVERO *et al.*, 2009), espalhando-se também para outras regiões (BRITO-SANTOS *et al.*, 2019).

Essas leveduras são encapsuladas e melanizadas, características que as identificam e atuam como fatores de virulência, auxiliando na proteção contra a resposta imune do hospedeiro (ZARAGOZA, 2019). A adaptação à temperatura fisiológica dos mamíferos é uma das habilidades destas leveduras e que as distinguem de outros fungos ambientais (CASADEVALL, 2006; PETTER *et al.*, 2001). Assim como outros microrganismos, também são capazes de formar biofilme, principalmente em superfícies de dispositivos médicos, o que é de grande preocupação para a saúde pública (AULER *et al.*, 2010; MCCONOUGHHEY *et al.*, 2014; PENK; PITTRROW, 1999).

O conjunto atual de antifúngicos disponíveis para tratar a criptococose é restrito a três medicamentos: desoxicolato de anfotericina B (AMB) e suas formulações lipídicas, flucitosina (5-fluorocitosina ou 5-FC) e fluconazol (FLC) (SPADARI *et al.*, 2020). A toxicidade apresentada por alguns fármacos, como a AMB, além do desenvolvimento de resistência e a dificuldade de penetração na barreira hemato-encefálica (BHE) para tratar infecções do sistema nervoso central (SNC) motivam a busca por compostos e moléculas com atividade antimicrobiana. Extratos de origem vegetal, incluindo óleos essenciais, são fontes promissoras de biomoléculas, tanto com atividade antibacteriana quanto antifúngica. Neste contexto, o trabalho propôs avaliar a atividade antifúngica do espilantol, alquilamida extraída de *Acmella oleracea*, contra as leveduras do complexo de espécies *Cryptococcus*, a fim de ser utilizada como terapia e diminuir a resistência da levedura no hospedeiro.

2. Objetivos

2.1 Objetivos gerais

Avaliar a atividade antifúngica do espilantol extraído de *Acmella oleracea* contra *Cryptococcus* spp.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a atividade antifúngica do espilantol contra *Cryptococcus* spp.;
- b) Definir a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da molécula;
- c) Avaliar o mecanismo de ação do espilantol com foco nos fatores de virulência criptocócicos.

3. Revisão da literatura

3.1 *Cryptococcus* sp.

Cryptococcus neoformans foi isolado pela primeira vez em 1894 pelos pesquisadores Otto Busse e Abraham Buschke de amostras de uma infecção óssea. Francesco Sanfelice, nesse mesmo ano, isolou uma levedura semelhante a partir da fermentação do suco de pêssigo e a denominou *Saccharomyces neoformans* (BUSSE, 1894; SANFELICE, [s. d.]). Em 1901, Jean-Paul Vuillemin transferiu a levedura para o gênero *Cryptococcus*, devido à ausência de ascósporos que caracterizam o gênero *Saccharomyces* (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). *Cryptococcus* spp. são classificados como Basidiomicetos, diferenciando-se da maioria dos fungos patogênicos humanos, que pertencem ao grupo dos Ascomicetos (ZARAGOZA, 2019). Atualmente, o gênero *Cryptococcus* é dividido em dois complexos, *C. neoformans* e *C. gattii*. O complexo de espécies *C. neoformans* engloba *C. neoformans*, o antigo *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, e *Cryptococcus deneoformans*, anteriormente conhecido como *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. O complexo *C. gattii* engloba as espécies *C. gattii*, antigamente chamada de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, *Cryptococcus deuterogattii*, *Cryptococcus bacillisporus*, *Cryptococcus decagattii*, *Cryptococcus tetragattii* e uma espécie sem denominação (MONTROYA; MAGWENE; PERFECT, 2021). Esses complexos compreendem os principais agentes etiológicos da criptococose, uma infecção sistêmica que afeta tanto indivíduos imunocomprometidos quanto imunocompetentes.

Enquanto *C. neoformans* é encontrado em fezes de aves e em solos contaminados, com distribuição mundial, *C. gattii* habita ocos de árvores e madeiras em decomposição, principalmente em climas tropicais e subtropicais (FILIÚ *et al.*, 2002; GULLO *et al.*, 2013). Os humanos entram em contato com a levedura frequentemente. Em indivíduos saudáveis e imunocompetentes, a infecção é eliminada ou permanece latente (BOVERS; HAGEN; BOEKHOUT, 2008; SPADARI *et al.*, 2020), uma vez que o pulmão é o primeiro órgão a ser colonizado e sua resposta imune é eficaz devido à constante exposição a partículas exógenas. Já em indivíduos imunossuprimidos, a levedura pode se disseminar pelo organismo, podendo chegar ao SNC (ZARAGOZA, 2019). *C. neoformans* é uma levedura oportunista, sendo responsável pela criptococose em pacientes imunocomprometidos, majoritariamente portadores do HIV (*Human*

Immunodeficiency Virus), enquanto *C. gattii* acomete principalmente indivíduos saudáveis (BOVERS; HAGEN; BOEKHOUT, 2008; FRANCO-PAREDES *et al.*, 2015). A presença de cápsula polissacarídica é uma característica fenotípica importante na identificação e diferenciação do gênero *Cryptococcus*, que desempenha um papel significativo na patogenicidade, possibilitando a evasão do sistema imunológico do hospedeiro (ZARAGOZA, 2019).

3.1.1 Fatores de virulência

Composta majoritariamente por glucuronoxilomanano (GXM) e glucuronoxilomanogalactano (GXMGal), e em menor grau por manoproteínas e estruturas semelhantes à quitina (ZARAGOZA, 2019), a cápsula polissacarídica criptocócica atua como proteção, tanto contra a dessecação quanto contra predadores naturais, como amebas e protozoários (FRAGER *et al.*, 2010; STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001). Os polissacarídeos capsulares, GXM e GXMGal, participam da evasão do sistema imune hospedeiro através da regulação negativa de citocinas inflamatórias, inibição da capacidade de apresentação de antígenos pelos monócitos e depleção dos componentes do sistema complemento (DECOTE-RICARDO *et al.*, 2019; O'MEARA; ALSPAUGH, 2012). Além disso, a cápsula polissacarídica ainda contribui como um escudo na superfície celular, dificultando a fagocitose pelos macrófagos (DEL POETA, 2004). Entretanto, quando a levedura é fagocitada, atua como eliminadora de espécies reativas de oxigênio (EROs), ajudando o fungo a resistir aos efeitos nocivos das mesmas (O'MEARA; ALSPAUGH, 2012; ZARAGOZA *et al.*, 2008). Variações fenotípicas capsulares podem ser observadas basicamente em três diferentes aspectos: alterações de tamanho, alterações estruturais de epítomos e variação no conteúdo polissacarídico e densidade (FELDMESSER; KRESS; CASADEVALL, 2001; VARTIVARIAN *et al.*, 1993; ZARAGOZA; CASADEVALL, 2004). Diante disso, o fenótipo acapsular de *C. neoformans* se traduz em uma cepa avirulenta, como demonstrada em trabalhos com deleção dos genes de formação da cápsula (CHANG; KWON-CHUNG, 1994, 1998; CHANG; PENOYER; KWON-CHUNG, 1996).

Cryptococcus têm a capacidade de adaptação à temperatura fisiológica humana (37° C), o que assegura a persistência durante a infecção, diferindo-a das outras espécies não patogênicas e de outros fungos ambientais. Além disso, a

adaptação a temperaturas elevadas favorece a sobrevivência no trato gastrointestinal de pombos, contribuindo para a disseminação ambiental dessas leveduras (PERFECT, 2006).

Um dos fatores que tornam a célula criptocócica termotolerante é a produção de melanina, que confere à célula resistência à fagocitose, a fatores estressantes, como radicais livres, radiação ionizante e calor, e resistência aos medicamentos antifúngicos (ZARAGOZA, 2019). Utilizando compostos exógenos, em princípio fornecidos pelo organismo hospedeiro, a levedura sintetiza o pigmento, que é depositado na camada externa da parede celular, ligado à quitina (EISENMAN *et al.*, 2011). A enzima lacase catalisa a biossíntese de melanina em *Cryptococcus* sp., e está envolvida na inibição de citocinas, como IL-17, como observado em *C. deuterogattii*, oportunizando o crescimento criptocócico pulmonar (HUANG *et al.*, 2022). Os substratos exógenos aproveitados para a síntese de melanina são frequentemente as catecolaminas, como a dopamina, epinefrina e norepinefrina, o que pode explicar o neurotropismo de *Cryptococcus*, tendo em vista a capacidade de conversão de catecolaminas em melanina (CASADEVALL; ROSAS; NOSANCHUK, 2000). A produção de melanina é apontada como um verdadeiro fator de virulência, visto que cepas mutantes sem a capacidade de melanização são menos virulentas (KWON-CHUNG; POLACHECK; POPKIN, 1982).

Cryptococcus secreta, além de outras enzimas, a urease. Ela catalisa a hidrólise de uréia, permitindo que a levedura a utilize como fonte de nitrogênio (SINGH *et al.*, 2013). Foi demonstrado que a urease desempenha um papel crucial na capacidade de *C. neoformans* atravessar a BHE durante a infecção, sendo portanto, fundamental para a invasão cerebral e meningoencefalite (SHI *et al.*, 2010). Além disso, a atividade de urease desempenha um papel crítico na modulação da integridade das junções endoteliais. A excreção de amônia, produto da hidrólise da uréia pelas células criptocócicas, contribui para o dano ao tecido do hospedeiro, apresentando também implicações significativas na evasão do sistema imunológico, por inibir a função dos fagócitos (RUTHERFORD, 2014).

Outras enzimas secretadas por *Cryptococcus* são as fosfolipases. A fosfolipase B, localizada na parede celular, hidrolisa fosfolipídeos, acarretando na desestabilização da membrana plasmática hospedeira e do surfactante pulmonar. A fosfolipase C também contribui para diferentes fenótipos de virulência, como a síntese de melanina e a capacidade de crescimento a 37°C, além de estar envolvida

na regulação da homeostase e integridade da parede celular (ALMEIDA; WOLF; CASADEVALL, 2015).

A resposta imune hospedeira desencadeia estresse oxidativo e nitrosativo contra os microrganismos patogênicos. *C. neoformans* apresenta sistemas antioxidantes que auxiliam na resistência ao estresse oxidativo gerado pelas espécies reativas de oxigênio (ERO). Estes sistemas englobam enzimas como a superóxido dismutase (CHATURVEDI; WONG; NEWMAN, 1996) e glutathione peroxidase (MISSALL; CHERRY-HARRIS; LODGE, 2005).

As cepas constituintes dos complexos de espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, assim como outros microrganismos, são capazes de formar comunidades de células extremamente organizadas e estruturadas aderidas a uma superfície: os biofilmes. Biofilmes são uma coleção de células aderidas a superfícies e em estados metabólicos distintos, onde as metabolicamente ativas estão nas camadas superiores e as células quiescentes no núcleo (SANTI *et al.*, 2014; SENEVIRATNE *et al.*, 2012), dificultando a ação de antimicrobianos. Além disso, estas células são protegidas por uma matriz extracelular (MEC) composta por substâncias poliméricas extracelulares (DONLAN, 2002; WATTERS *et al.*, 2016), o que dificulta a ação do sistema imune humano. Logo, uma preocupação recorrente para a saúde pública é a formação de biofilme em dispositivos médicos, como cateteres e próteses, levando à persistência e resistência microbiana (AULER *et al.*, 2010; BANERJEE; GUPTA; VENUGOPAL, 1997; BRAUN *et al.*, 1994; LYNCH; ROBERTSON, 2008; MCCONOUGHIEY *et al.*, 2014; PENK; PITTROW, 1999; RAMAGE *et al.*, 2009; RAMAGE; WILLIAMS, 2013). Sugere-se que os fatores de virulência clássicos não são os únicos responsáveis pela patogenicidade em mamíferos, e que as características genóticas e fenóticas criptocócicas necessárias para a patogenicidade e virulência variam conforme o genótipo e o fenótipo do hospedeiro (MONTROYA; MAGWENE; PERFECT, 2021).

3.2 Tratamentos antifúngicos para criptococose

Recentemente, *C. neoformans* e *C. gattii* foram classificados pela *World Health Organization* (WHO) *Fungal Priority Pathogens List* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022) como patógenos fúngicos prioritários, estando *C. neoformans* classificado como prioridade crítica, juntamente com *Candida auris*, *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans*, e *C. gattii* no grupo de prioridade média.

Atualmente, os três medicamentos disponíveis e aprovados para o tratamento da criptococose são o Fluconazol (FLC), Anfotericina B (AmB) e Flucitosina (5FC) (ZHAO *et al.*, 2023). Polienos, como a AmB, se ligam ao ergosterol de membrana plasmática, abrindo poros e extravasando o material intracelular, ao passo que os azóis, como o FLC, inibem a atividade da enzima lanosterol 14 α -desmetilase, interrompendo de forma direta a biossíntese do ergosterol. A 5FC ou 5-fluorocitosina é um análogo de pirimidina que bloqueia a síntese de DNA; entretanto, não pode ser aplicada como monoterapia devido ao recorrente desenvolvimento de resistência (IYER *et al.*, 2021).

Segundo o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018), o tratamento para meningite criptocócica ocorre em três etapas: fase de indução, consolidação e manutenção. Na fase de indução, AmB e 5FC representam a escolha principal de terapia, ou ainda, AmB e FLC, quando na ausência de 5FC. Na fase de consolidação, que percorre no mínimo oito semanas, e na fase de manutenção, de pelo menos doze meses, o FLC é o fármaco priorizado.

Apesar da utilização desses medicamentos, os mesmos apresentam toxicidade, como é o caso da AmB, que pode se ligar facilmente ao colesterol da membrana plasmática do hospedeiro humano, representando o principal fator limitante no uso deste fármaco. A nefrotoxicidade da AmB está associada à diminuição de 80% da capacidade de filtração glomerular e a mielotoxicidade associada à anemia por alterações na síntese de eritropoietina (GULLO *et al.*, 2013). Formulações lipídicas de anfotericina demonstram eficácia micológica comparável à da formulação convencional (anfotericina B desoxicolato), porém com redução de toxicidade renal, hipocalcemia e anemia (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; CATALÁN; MONTEJO, 2006; IYER *et al.*, 2021). Ainda que a AmB apresente toxicidade, continua sendo o padrão-ouro para tratamento de infecções fúngicas graves, como a criptococose.

Por outro lado, a 5FC e o FLC apresentam menor toxicidade e menos efeitos adversos, além de boa penetração no LCR. As reações adversas mais graves promovidas pela 5FC são a leucopenia e a trombocitopenia, dose-dependentes e reversíveis, bem como a hepatotoxicidade e a eosinofilia. O FLC e os azóis, de modo geral, são bastante seguros e bem tolerados, apresentando baixo risco de reações adversas graves (CATALÁN; MONTEJO, 2006).

C. neoformans e *C. gattii* apresentam resistência intrínseca às equinocandinas (DENNING, 2003) e aos azóis (CHEN *et al.*, 2017; SIONOV *et al.*, 2009; STONE *et al.*, 2019), aparentemente causada pela duplicação cromossômica. Sua plasticidade genômica possibilita a modificação da estrutura genômica em resposta ao estresse causado por agentes antifúngicos, principalmente por azóis. Esse evento é conhecido como heterorresistência, onde há uma subpopulação resistente internamente à uma cepa suscetível (HU *et al.*, 2011; IYER *et al.*, 2021).

Como já citado anteriormente, a presença da melanina na parede celular criptocócica contribui para a resistência a certos agentes antifúngicos, diminuindo principalmente a susceptibilidade do fungo à AmB. Por outro lado, a melanização não protege contra o FLC ou 5FC (VAN DUIN; CASADEVALL; NOSANCHUK, 2002).

3.3 Biodiversidade como fonte de moléculas

A família Asteraceae é bem conhecida por suas aplicações medicinais e comestíveis, abrangendo mais de 1.600 gêneros e 25.000 espécies, incluindo camomila, girassol e absinto. Embora sejam mais prevalentes em regiões áridas e semiáridas de áreas subtropicais, essas espécies são distribuídas globalmente. Os integrantes da família Asteraceae exibem uma ampla variedade de atividades, incluindo propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes e hepatoprotetoras (ROLNIK; OLAS, 2021).

Um dos representantes dessa família é a *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Asteraceae) (sin. *Spilanthes acmella* var. *oleracea* (L.) Baker; *Spilanthes acmella* var. *oleracea* (L.) C.B. Clarke ex Hook. f. e bas. *Spilanthus oleracea* L.) (Figura 1). Popularmente conhecida como jambu, é uma planta nativa do Brasil, encontrada majoritariamente em regiões tropicais e subtropicais (PAULRAJ; GOVINDARAJAN; PALPU, 2013). Além de ser empregada como ingrediente na culinária característica da região amazônica, *A. oleracea* é extensivamente empregada na medicina ayurvédica e é conhecida popularmente como um agente anti-inflamatório, antisséptico e anestésico desde épocas históricas. Nas práticas medicinais tradicionais, as flores são mastigadas para proporcionar alívio de dores de dente e infecções de garganta, além de serem utilizadas para induzir a paralisia e o formigamento temporário da língua (SHARMA; ARUMUGAM, 2021).



Figura 1. *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Asteraceae). Fonte: iStock

A análise fitoquímica de *A. oleracea* documenta a presença de diferentes classes de compostos bioativos, dentre eles triterpenóides, flavonóides, estigmasterol e alcalóides, destacando-se pela abundância de alquilamidas (ABEYSIRI *et al.*, 2013; BELLUMORI *et al.*, 2022; NAKATANI; NAGASHIMA, 1992; RONDANELLI *et al.*, 2020). As propriedades biológicas de *A. oleracea* são atribuídas principalmente às N-alquilamidas, sendo o espilantol a alquilamida majoritariamente presente e responsável pelo efeito analgésico e anestésico da planta (ABEYSIRI *et al.*, 2013; DALLAZEN *et al.*, 2020; RONDANELLI *et al.*, 2020). O espilantol (Figura 2), isolado pela primeira vez em 1903 (GERBER, 1903) e nomeado como afinina por alguns autores, dentre as inúmeras atividades identificadas, como antimalárica e inseticida (KAVALLIERATOS *et al.*, 2023; MORENO *et al.*, 2012; RAJENDRAN *et al.*, 2017; SPELMAN *et al.*, 2011) demonstrou ser fungistático e bacteriostático (MOLINA-TORRES *et al.*, 2004), incluindo efeito inibitório significativo contra uma cepa multirresistente de *Candida albicans* (FABRI *et al.*, 2021).

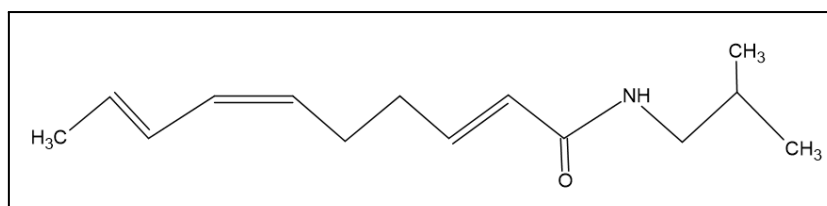


Figura 2. Estrutura molecular do espilantol, (2E,6Z,8E)-N-isobutil-2,6,8-decatrienamida. (Fonte: Autora, 2024).

A BHE é uma barreira biológica que separa o SNC do restante do sistema circulatório, regendo rigorosamente o acesso de substâncias ao cérebro. A habilidade de uma substância em ultrapassar a BHE pode estar sujeita a diversos fatores, tais como sua estrutura química, tamanho molecular e afinidade por transportadores específicos presentes na BHE (PARDRIDGE, 2012). Foi evidenciado que o espilantol, além de atravessar a barreira intestinal por meio de difusão passiva, também é capaz de se difundir para o SNC. Nesse processo, 98% do espilantol foi identificado no parênquima cerebral, restando apenas 2% retido nos capilares (VERYSER *et al.*, 2016). Essa descoberta expande as possibilidades de aplicação do espilantol no âmbito da saúde, destacando-se como uma opção promissora para o tratamento da criptococose. Seu potencial no combate à meningite é particularmente notável, dada sua penetração eficaz da BHE.

Diante dos desafios associados ao tratamento convencional, como toxicidade e o desenvolvimento de resistência, a avaliação da atividade do espilantol contra *Cryptococcus* sp. emerge como uma perspectiva válida e promissora.

4. Materiais e Métodos

4.1 Manutenção e cultivo dos microrganismos

Os isolados *C. deuterogattii* R265 e R272, *C. neoformans* H99 e *C. deneoformans* B3501 foram cultivados e mantidos em meio Sabouraud (2% glicose, 1,5% extrato de levedura) em estufa a 37°C, por 48h.

4.2 Material vegetal

4.2.1 Produção do extrato hexânico

As folhas de *A. oleraceae* foram submetidas à maceração com etanol (1:5, p:v) por 24h. O extrato etanólico resultante foi concentrado e liofilizado. Parte deste extrato foi particionado com n-hexano (1:1 v/v), originando o extrato hexânico. Este extrato foi novamente liofilizado e, no momento do uso, ressuspendido em 10% DMSO para realização dos experimentos.

4.2.2 Isolamento da molécula

O extrato hexânico foi fracionado em coluna de sílica gel, utilizando uma mistura de n-hexano e acetato de etila como fase móvel, iniciando com 100% n-hexano até atingir a composição 50%/50%. Todas as frações adquiridas foram submetidas ao rotaevaporador e o espilantol foi identificado por HPLC.

4.3 Concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM foi determinada seguindo o método de suscetibilidade de microdiluição estabelecido pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2008), norma M27-A3, variando de 2 mg/mL a 0,03 mg/mL. Os experimentos foram realizados em oito replicatas e a CIM foi definida como a menor concentração que inibe visualmente o crescimento do microrganismo. A atividade fungicida ou fungistática foi avaliada através do teste de gota das concentrações da CIM, 2x CIM e 4x CIM: 10 µL de cada poço foi inoculado em placas de meio Sabouraud, mantidas por até 48h em estufa a 37 °C. Para realização dos experimentos, o espilantol foi ressuspendido em 100 mg/mL de DMSO.

4.4 Avaliação do mecanismo de ação

Os ensaios para investigação do mecanismo de ação do espilantol foram realizados contra o isolado *C. neoformans* H99.

4.4.1 Extravasamento intracelular

A avaliação do extravasamento de material intracelular foi realizada conforme descrito previamente (VASIREDDY; BINGLE; DAVIES, 2018) com pequenas modificações. As células foram cultivadas em 50 mL de meio Sabouraud por 20h a 35°C e 150 rpm. Após, foram separadas por centrifugação, lavadas 3x com PBS e ressuspensas no mesmo tampão. Em seguida, dividiu-se 10 mL da suspensão de células em cada um dos três grupos: controle (1,9% de DMSO, 192,3 µL); tratado (½ CIM, 250 µg/mL); e controle de extravasamento por fervura (100°C, 10 min). Os grupos foram incubados a 35°C e 150 rpm. Amostras foram coletadas nos tempos 30 min, 1h, 2h e 4h. Em seguida, foram centrifugadas e o sobrenadante foi quantificado em espectrofotômetro a 260 nm.

4.4.2 Quantificação de ergosterol

O ergosterol de membrana foi quantificado tendo como base o método descrito por (ARTHINGTON-SKAGGS *et al.*, 1999). A levedura foi inoculada por 20h a 35°C e 150 rpm, em três grupos: controle (0,83% de DMSO, 416 µL), tratado (½ CIM, 250 µg/mL) e controle positivo contendo fluconazol (5 µg/mL), antifúngico que atua sobre a síntese do ergosterol. Após centrifugar e lavar as células 3x com PBS, o ergosterol foi extraído com 3 mL de solução alcoólica KOH 25%. Os grupos foram incubados em banho-maria a 85°C durante 1h e, em seguida, o ergosterol foi recuperado com uma mistura de 1:3 água destilada estéril e n-heptano. A camada de heptano foi quantificada em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 230 nm, em que se detecta um intermediário de ergosterol, 24(28)DHE, e 281 nm, em que se detecta o ergosterol e seu intermediário. Para o cálculo do conteúdo de ergosterol, as seguintes fórmulas foram aplicadas: (A) % ergosterol + % 24(28)DHE = (ABS_{281/290})/peso do pellet; (B) % 24(28)DHE = (ABS_{230/518})/peso do pellet; (C) % ergosterol = (A) - (B).

4.4.3 Quantificação de EROs

A quantificação de EROs foi conduzida conforme metodologia previamente descrita (FERREIRA *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2020). Células (10⁵ células/mL) foram inoculadas em grupos distintos: controle (0,48% de DMSO, 240 µL), tratado (½ CIM, 250 µg/mL) e controle positivo, contendo H₂O₂ [5 µM] por 20h a 35°C e 150 rpm. Após este período, as células foram centrifugadas, lavadas 3x com PBS, contadas em câmara de Neubauer e 10⁵ células/mL foram incubadas com 10 µM de

2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) por 30 min a 37°C. Para cada grupo foi feito um branco, substituindo a sonda DCFH-DA por PBS. A fluorescência foi quantificada em 428 e 528 nm em espectrofotômetro do tipo Spectramax. Os resultados da quantificação de EROs foram obtidos pela divisão das leituras da amostra (Absorbância da amostra - Absorbância do branco da amostra) pelas leituras do controle (Absorbância do controle - Absorbância do branco do controle), multiplicado por 100.

4.4.4 Quantificação de cápsula polissacarídica

A cápsula polissacarídica de *C. neoformans* foi avaliada conforme descrito em (FRASES *et al.*, 2009). Células (10^8 células/ mL) foram incubadas em 5 mL de meio indutor (10% soro fetal bovino em PBS) contendo ou não espilantol ($\frac{1}{2}$ CIM). Ao controle foi adicionado 24 μ L de DMSO, equivalente ao utilizado na concentração de $\frac{1}{2}$ CIM. Após incubação por 24h a 35°C e 150 rpm, as células foram centrifugadas e lavadas 3x com PBS. As células foram misturadas com tinta nanquim e visualizadas em microscópio acoplado com câmera (aumento de 40x). Foram feitas imagens e cápsulas de 20 células de cada grupo foram analisadas utilizando o software ImageJ 1.53k (National Institutes of Health, USA).

4.4.5 Ensaio de urease

Para quantificação da urease, as células foram pré-incubadas em meio Sabouraud sob agitação por 20h, 35°C, 150 rpm. Após centrifugar, lavar 3x e ressuspender em PBS, as células foram ajustadas para OD 600nm = 1. A cultura foi incubada com 1mL de meio de uréia (0,1% peptona, 0,1% glicose, 0,5% cloreto de sódio, 0,2% fosfato monopotássico, 2% uréia, 0,012% vermelho de fenol) (HALEVA *et al.*, 2020) em dois grupos distintos: controle (0,5% de DMSO, 10 μ L) e tratado ($\frac{1}{2}$ CIM, 250 μ g/mL). Amostras foram coletadas nos tempos 2h, 4h e 6h, centrifugadas e o sobrenadante foi quantificado em espectrofotômetro a 560 nm.

4.4.6 Análises estatísticas

Para a análise estatística dos experimentos conduzidos, os resultados foram analisados através do Teste t (urease e EROs) e ANOVA (ergosterol, extravasamento intracelular e cápsula polissacarídica), utilizando o software GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad, USA).

5. Resultados e discussão

5.1 Concentração Inibitória Mínima

A determinação da CIM é uma etapa fundamental na avaliação da atividade inibitória de um extrato ou composto. Aqui, a CIM do espilantol foi avaliada para os quatro isolados de *Cryptococcus* (Tabela 1). Para *C. neoformans* H99 o valor foi de 500 µg/mL, bem como para os isolados de *C. deuterogattii* R265 e R272, enquanto que para *C. deneoformans* B3501 a CIM foi de 250 µg/mL. Os valores foram avaliados quanto à atividade fungicida ou fungistática, demonstrando que todas as CIMs encontradas são fungistáticas. Uma análise do extrato metanólico das flores de *Chrysactinia mexicana*, pertencente à mesma família de *A. oleracea* (Asteraceae), revelou uma CIM de 1000 µg/mL contra *C. neoformans* (SALAZAR-ARANDA *et al.*, 2011). A atividade antifúngica do espilantol contra *Saccharomyces cerevisiae* foi avaliada (MOLINA-TORRES; GARCÍA-CHÁVEZ; RAMÍREZ-CHÁVEZ, 1999), revelando uma CIM inferior a 25 µg/mL e uma inibição de aproximadamente 90% no crescimento fúngico. Apesar de apresentarem valores mais elevados em comparação com a CIM para *S. cerevisiae*, é importante considerar a maior complexidade estrutural e fisiológica de *Cryptococcus*, especialmente em relação à presença da cápsula, o que dificulta a penetração de compostos, como o espilantol.

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) da molécula natural espilantol contra leveduras do gênero *Cryptococcus* sp.

| Espécie | Cepa | CIM µg/mL |
|-------------------------|-------|-----------|
| <i>C. neoformans</i> | H99 | 500* |
| <i>C. deneoformans</i> | B3501 | 250* |
| <i>C. deuterogattii</i> | R265 | 500* |
| | R272 | 500* |

(*) efeito fungistático

Vale destacar a similaridade estrutural entre o espilantol e o NAC (3-decinoil-N-acetilcisteamina), um inibidor sintético da β-hidroxidecanoil desidratase. O NAC, que bloqueia a síntese de ácidos graxos insaturados, inibe totalmente o crescimento de *Escherichia coli* (10 µM), enquanto exerce somente atividade leve e transitória no crescimento de *S. cerevisiae* (KASS, 1968). Isso

sugere que o espilantol também pode manifestar atividades distintas entre fungos e bactérias. Os dados fornecidos por MOLINA-TORRES *et al.* (2004) corroboram essa ideia ao avaliarem a atividade inibitória do espilantol e de duas modificações estruturais do composto. Os resultados indicam que a atividade antifúngica persiste exclusivamente para o espilantol, e, ao retirar as insaturações da molécula, essa atividade é perdida. Em contrapartida, a retirada das insaturações em C6 e C8 resulta em maior atividade bacteriostática. Portanto, o mecanismo de ação do espilantol em fungos e bactérias ainda precisa ser bem elucidado, visto que apresenta mecanismos diferentes entre os microrganismos.

O espilantol atravessa rapidamente a BHE, conforme evidenciado por um influxo altamente significativo para o cérebro, sendo que aproximadamente 98% do espilantol alcança o parênquima cerebral (VERYSER *et al.*, 2016). Essa rápida penetração na BHE é crucial para a compreensão da distribuição eficiente do espilantol no SNC, e representa uma característica favorável para considerar sua aplicação no tratamento da criptococose.

Para dar seguimento aos experimentos de avaliação do mecanismo de ação do espilantol, o isolado H99 foi selecionado, visto que este é considerado um modelo de estudo desta levedura.

5.2 Espilantol causa alteração na membrana celular

Existem dois mecanismos de ação antifúngica relacionados ao ergosterol: (a) a habilidade de se ligar à membrana de ergosterol, formando poros nessa estrutura; e (b) a capacidade de inibir enzimas essenciais na síntese de ergosterol, causando redução do conteúdo dessa molécula (CARVALHO *et al.*, 2018). LI *et al.* (2017) demonstraram que o ácido gálico exibe a capacidade de reduzir o teor de ergosterol em fungos filamentosos, como *Trichophyton rubrum*, e esse efeito é obtido por meio da inibição de enzimas cruciais, como a esterol 14 α -desmetilase e a esqualeno epoxidase.

Diante de estudo prévio que sugeriu o efeito inibitório do espilantol contra *C. albicans* e seu importante dano à membrana plasmática fúngica (FABRI *et al.*, 2021), investigamos se essa molécula exerceria uma influência semelhante na membrana celular de *C. neoformans*. Da mesma forma, o espilantol provoca a instabilidade da membrana plasmática criptocócica através da redução significativa dos níveis de ergosterol na célula, em comparação com o grupo controle (Figura 3). Essa redução

de conteúdo de ergosterol se assemelha à redução causada pelo FLC, que é conhecido por inibir a síntese de ergosterol. A diminuição de ergosterol pode resultar no surgimento de poros, o que induz a ruptura da membrana celular, levando ao extravasamento do conteúdo citoplasmático e causando dano oxidativo, o que culmina na morte das células fúngicas (CAMPOY; ADRIO, 2017). Recentemente, compostos derivados de quinolina demonstraram efeitos semelhantes contra espécies de *Candida* e dermatófitos (PIPPI *et al.*, 2019).

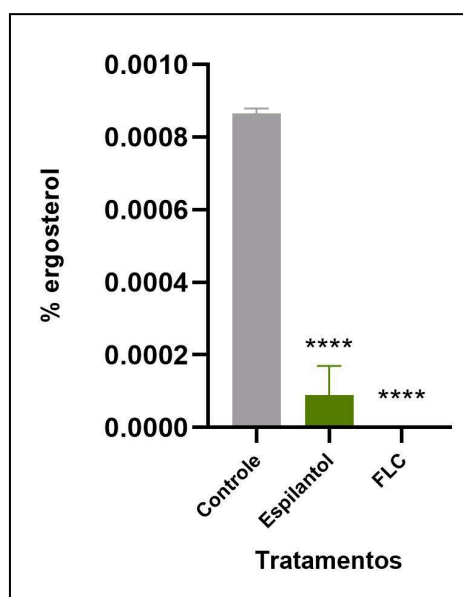


Figura 3. Atividade de espilantol sobre o ergosterol de *Cryptococcus neoformans* H99. Células foram expostas ao espilantol ($\frac{1}{2}$ CIM, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou não (controle, 0,83% DMSO, 416 μL). Como controle positivo foi utilizado o Fluconazol (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). **** $p < 0,0001$.

O ensaio de extravasamento intracelular também indica que o espilantol causa alteração na membrana plasmática. Ao final de quatro horas de exposição à molécula, há liberação de conteúdo intracelular cerca de 2,5 vezes maior quando comparado ao grupo controle (Figura 4). O extravasamento causado pela molécula se assemelha ao extravasamento total da célula causado pela fervura. Efeito semelhante foi sugerido em um isolado clínico resistente de *C. albicans* exposto aos fitocompostos, cinamaldeído e eugenol, os quais causaram danos à membrana e à parede celular fúngica, levando ao extravasamento do material intracelular (KHAN; AHMAD; CAMEOTRA, 2013).

Ao que tudo indica, além da desestabilização da membrana pela redução de ergosterol, o espilantol também leva à perda de material intracelular. Portanto,

podemos propor que a membrana plasmática fúngica é um provável alvo de ação do espilantol.

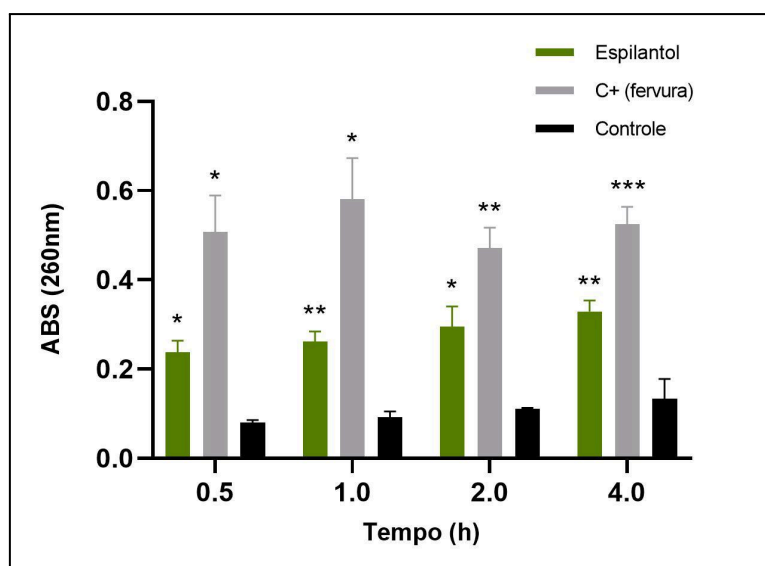


Figura 4. Avaliação do extravasamento intracelular ocasionado pelo espilantol sobre *Cryptococcus neoformans* H99. Espilantol: células expostas à ½ CIM (250 µg/mL); C+: células rompidas por fervura a 100°C por 10 minutos; Controle: células sem tratamento, apenas DMSO foi adicionado. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

5.3 Aumento de espécies reativas de oxigênio causado pelo espilantol

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são capazes de danificar lipídios, carboidratos e proteínas, ameaçando a integridade celular (RIBEIRO; BOURBON-MELO; SÁ-CORREIA, 2022). Os mecanismos de proteção celular contra o estresse oxidativo envolvem sistemas antioxidantes, tanto enzimáticos quanto não enzimáticos, que trabalham para reduzir a geração de EROs. No âmbito dos sistemas enzimáticos, destacam-se a superóxido dismutase (SOD) (CHATURVEDI; WONG; NEWMAN, 1996), tiol peroxidase (MISSALL; PUSATERI; LODGE, 2004) e a glutationa peroxidase (MISSALL; CHERRY-HARRIS; LODGE, 2005), desempenhando papéis essenciais nos mecanismos antioxidantes de *C. neoformans*.

Foi relatado que antifúngicos, como a AmB, induzem a formação de EROs em diferentes espécies de leveduras patogênicas, incluindo *C. neoformans* e *C. gattii*, induzindo danos oxidativos à célula, possivelmente levando à morte celular (GUIRAO-ABAD *et al.*, 2017; MESA-ARANGO *et al.*, 2014). Aqui, a exposição das

células de *C. neoformans* ao espilantol provocou um aumento significativo nas EROs (Figura 5). Após 20 horas de tratamento com $\frac{1}{2}$ CIM da molécula natural, observou-se um incremento de aproximadamente 487% nas EROs em comparação com o controle, no qual os sistemas antioxidantes da levedura parecem ser eficazes. O grupo exposto ao peróxido de hidrogênio, um indutor de EROs, apresentou um aumento de 73% em relação ao controle. A produção de EROs desencadeia a peroxidação lipídica, um processo que implica na degradação oxidativa dos lipídios. Isso ocorre quando uma cadeia de radicais livres é formada, resultando no roubo de elétrons dos lipídios presentes nas membranas celulares, especialmente ácidos graxos poliinsaturados, resultando em danos celulares. Notavelmente, esse fenômeno ocorre dinamicamente e está associado à inibição da enzima esterol 14α -desmetilase, que apresenta papel crucial na biossíntese do ergosterol (FERREIRA *et al.*, 2013). Os achados sugerem que o espilantol pode promover notavelmente o aumento das EROs, acarretando danos à membrana plasmática, o que corrobora com a diminuição do conteúdo de ergosterol e contribui para o aumento de extravasamento de material intracelular.

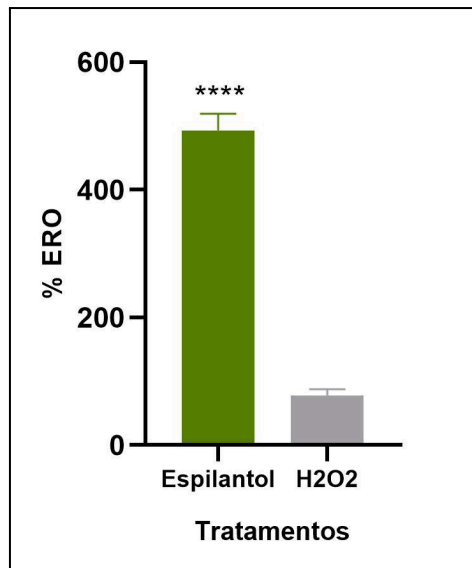


Figura 5. Porcentagem de espécies reativas de oxigênio (EROs) em *Cryptococcus neoformans* H99 sob tratamento com espilantol e peróxido de hidrogênio. Grupo espilantol exposto à $\frac{1}{2}$ CIM (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e grupo controle positivo tratado com peróxido de hidrogênio. O percentual de EROs foi calculado comparando-se ao controle negativo (contendo 0,48% de DMSO, 240 μL). **** p-value <0,0001.

5.4 Efeito do espilantol sobre a cápsula polissacarídica

A cápsula é uma característica importante na patogenicidade do *Cryptococcus*, pois desempenha um papel na resistência a fagocitose e em outros mecanismos de defesa do hospedeiro (CASADEVALL *et al.*, 2019). Aqui, demonstramos que a exposição de *C. neoformans* H99 ao espilantol, extraído de *A. oleracea*, induz o aumento da cápsula polissacarídica (Figura 6). O aumento na produção de cápsula em *Cryptococcus* pode ser desencadeado por diversos estímulos, incluindo condições de baixa disponibilidade de ferro e variações no pH (BOSE *et al.*, 2003; VARTIVARIAN *et al.*, 1993), bem como durante infecções *in vivo* (GARCÍA-RODAS *et al.*, 2011) e em resposta a fosfolipídios durante interações com macrófagos e amebas (CHRISMAN *et al.*, 2011). Esse aumento capsular, quando confrontado com o estresse oxidativo, desempenha um papel crucial como um eficiente captador de radicais livres, protegendo as células contra oxidantes, especialmente aqueles gerados por células fagocíticas durante a infecção (ZARAGOZA *et al.*, 2008). Considerando o aumento de EROs encontrado no presente estudo (Item 5.3), é possível sugerir que o aumento capsular observado em *C. neoformans*, em resposta à exposição ao espilantol, representa uma estratégia defensiva contra o excesso de EROs geradas nessas condições.

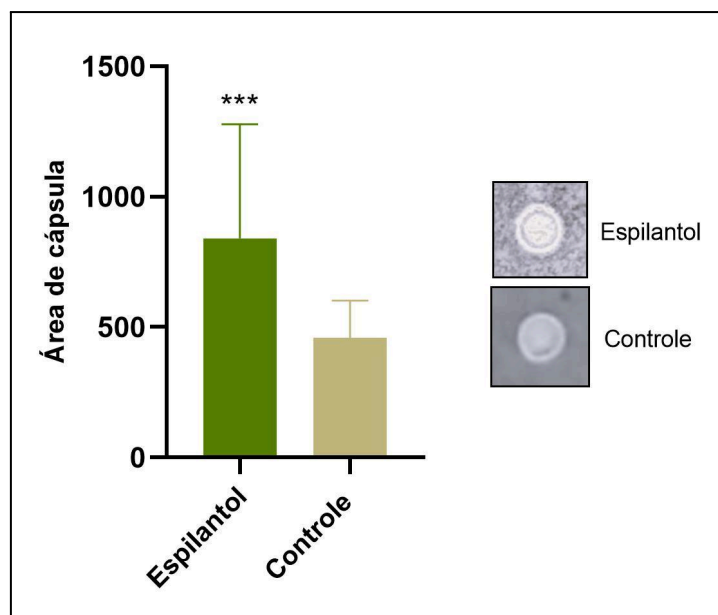


Figura 6. Atividade de espilantol sobre a cápsula polissacarídica de *Cryptococcus neoformans* H99. Células foram expostas ao espilantol ($\frac{1}{2}$ CIM, 250 $\mu\text{g/mL}$) ou não (controle, 24 μL DMSO). *** $p < 0,001$.

5.5 Espilantol causa diminuição da atividade de urease

A urease é uma enzima necessária para a sobrevivência de *C. neoformans*, apresentando um papel essencial na patogenicidade do fungo (CHEN *et al.*, 2022). Essa enzima desempenha um papel importante na invasão do SNC, ao promover o sequestro da levedura dentro dos leitos microcapilares, como no cérebro, durante a disseminação hematogênica. Esse efeito é possivelmente mediado pela produção de amônia a partir da ureia e de outros produtos nitrogenados do plasma do hospedeiro. Paralelo a isso, a amônia pode contribuir também para a toxicidade das células endoteliais, afetar os astrócitos e enfraquecer a integridade da BHE (OLSZEWSKI *et al.*, 2004). Ainda, a amônia produzida eleva o pH local e impede que os fagossomos de fagócitos alcancem a acidificação adequada, a maturação e exibam um efeito fungicida (RUTHERFORD, 2014). Esse mecanismo propicia a invasão do sangue para o cérebro e a diminuição da atividade de urease pode indicar um potencial caminho terapêutico para modular esse processo invasivo.

Aqui, observamos que a atividade de urease foi reduzida ao longo de seis horas de exposição ao espilantol, apresentando uma diminuição de cerca de 56%, quando comparado ao controle sem tratamento (Figura 7). O desenvolvimento de terapias com atividade antivirulência oferece uma vantagem substancial ao reduzir a probabilidade de desenvolver resistência, em comparação com os agentes antimicrobianos convencionais. A atividade antivirulência está centrada na inibição ou modulação dos fatores de virulência dos patógenos, como a atividade de urease em *Cryptococcus*, em vez de atuar diretamente em sua sobrevivência ou crescimento. A adoção de terapias combinadas reflete uma mudança significativa na abordagem, direcionada a diversos alvos celulares durante o tratamento de infecções (ENIOUTINA *et al.*, 2017), como a criptococose.

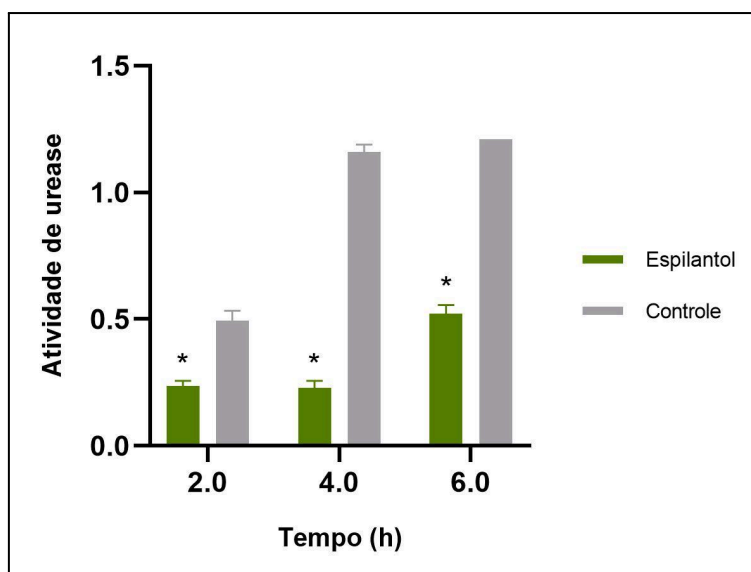


Figura 7. Efeito do espilantol sobre a atividade de urease de *Cryptococcus neoformans* H99 em diferentes tempos. Grupo espilantol exposto à $\frac{1}{2}$ CIM (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e grupo controle sem tratamento, apenas DMSO adicionado (0,5%, 10 μL). * p-value <0,001.

Observamos que o espilantol atua sobre barreiras celulares (Figura 8), como cápsula e membrana plasmática. Além disso, o espilantol parece atuar sobre a urease, importante fator de virulência da levedura, o que é interessante quando se visa a busca por novos agentes antifúngicos.

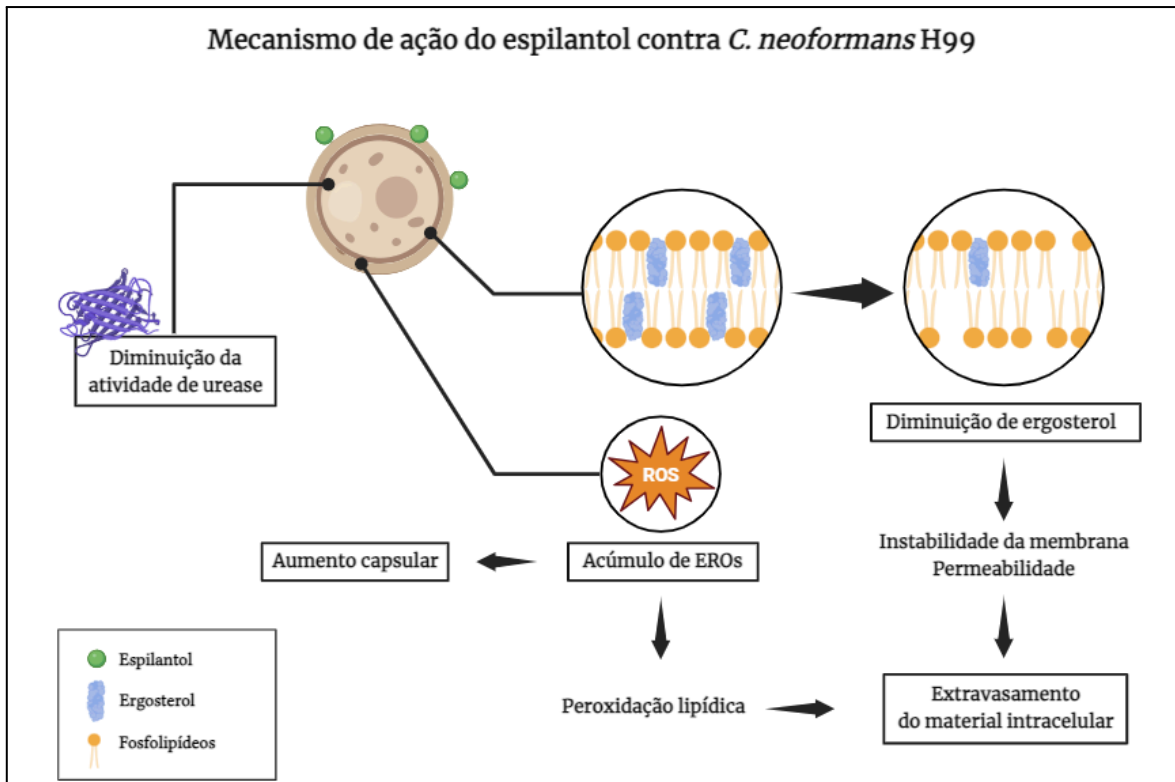


Figura 8. Elucidação do mecanismo de ação do espilantol contra *C. neoformans* H99 a partir dos resultados deste trabalho (Fonte: Autora, 2024).

6. Conclusão

Os resultados elucidam os múltiplos mecanismos pelos quais o espilantol exerce sua atividade antifúngica contra *C. neoformans*. Interligando os achados, sugerimos que o espilantol desestabiliza a membrana plasmática fúngica por meio da redução significativa dos níveis de ergosterol, semelhante ao efeito de antifúngicos convencionais como o fluconazol, e pelo aumento considerável na produção de EROs, levando à peroxidação lipídica e danos celulares associados à inibição da enzima esteroide 14 α -desmetilase. Surpreendentemente, o espilantol também induz um aumento na cápsula polissacarídica de *C. neoformans*, possivelmente como uma resposta defensiva contra o estresse oxidativo causado pelo aumento das EROs. A redução significativa na atividade de urease, uma enzima crucial para a virulência de *C. neoformans*, sugere um potencial caminho terapêutico para modular a invasão do sistema nervoso central por esse patógeno. Esses resultados destacam o espilantol como um agente promissor no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra infecções fúngicas, especialmente a criptococose, e ressaltam a importância da pesquisa de compostos naturais para o tratamento de doenças infecciosas.

REFERÊNCIAS

- ABEYSIRI, G. R. P. I. *et al.* Screening of phytochemical, physico-chemical and bioactivity of different parts of *Acmella oleraceae* Murr. (Asteraceae), a natural remedy for toothache. **Industrial crops and products**, [s. l.], v. 50, p. 852–856, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669013004603>.
- ALMEIDA, F.; WOLF, J. M.; CASADEVALL, A. Virulence-Associated Enzymes of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic cell**, [s. l.], v. 14, n. 12, p. 1173–1185, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/EC.00103-15>.
- ARTHINGTON-SKAGGS, B. A. *et al.* Quantitation of ergosterol content: novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans*. **Journal of clinical microbiology**, [s. l.], v. 37, n. 10, p. 3332–3337, 1999. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.37.10.3332-3337.1999>.
- AULER, M. E. *et al.* Biofilm formation on intrauterine devices in patients with recurrent vulvovaginal candidiasis. **Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 211–216, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3109/13693780902856626>.
- BANERJEE, U.; GUPTA, K.; VENUGOPAL, P. A case of prosthetic valve endocarditis caused by *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. **Journal of medical and veterinary mycology: bi-monthly publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 139–141, 1997. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9147274>.
- BELLUMORI, M. *et al.* *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen: Alkylamides and phenolic compounds in aerial parts and roots of in vitro seedlings. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, [s. l.], v. 220, p. 114991, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114991>.
- BOSE, I. *et al.* A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic cell**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 655–663, 2003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/EC.2.4.655-663.2003>.
- BOVERS, M.; HAGEN, F.; BOEKHOUT, T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. **Revista iberoamericana de micologia**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. S4–S12, 2008. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s1130-1406\(08\)70019-6](http://dx.doi.org/10.1016/s1130-1406(08)70019-6).
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018. [S. l.: s. n.], [s. d.]. *E-book*. Disponível em: <http://nhe.fmrp.usp.br/wp-content/uploads/2019/08/2018-PCDT-MANEJO-DA-INFEC-CAO-PELO-HIV-EM-ADULTOS.pdf>.
- BRAUN, D. K. *et al.* Cryptococcal infection of a prosthetic dialysis fistula. **American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 864–867, 1994. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0272-6386\(12\)80683-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0272-6386(12)80683-4).

BRITO-SANTOS, F. *et al.* Cryptococcosis due to *Cryptococcus gattii* VGII in southeast Brazil: The One Health approach revealing a possible role for domestic cats. **Medical mycology case reports**, [s. l.], v. 24, p. 61–64, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mmcr.2019.04.004>.

BUSSE, O. Über parasitare zelleinschlüsse und ihre zuchtung. **Zentralblatt für Bakteriologie: international journal of medical microbiology**, [s. l.], v. 16, p. 175–180, 1894. Disponível em: <https://cir.nii.ac.jp/crid/1570291225300545280>. Acesso em: 7 dez. 2023.

CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochemical pharmacology**, [s. l.], v. 133, p. 86–96, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.019>.

CARVALHO, R. S. *et al.* Antibacterial and antifungal activities of phenolic compound-enriched ethyl acetate fraction from *Cochlospermum regium* (mart. Et. Schr.) Pilger roots: Mechanisms of action and synergism with tannin and gallic acid. **South African journal of botany: official journal of the South African Association of Botanists = Suid-Afrikaanse tydskrif vir plantkunde: amptelike tydskrif van die Suid-Afrikaanse Genootskap van Plantkundiges**, [s. l.], v. 114, p. 181–187, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629917308773>.

CASADEVALL, A. Cards of virulence and the global virulome for humans. **Microbe-American Society for Microbiology**, [s. l.], v. 1, n. 8, p. 359, 2006. Disponível em: [http://josedondarza.com/Bio406/pdf/Microbe%201\(8\)359-364,%202006.pdf](http://josedondarza.com/Bio406/pdf/Microbe%201(8)359-364,%202006.pdf).

CASADEVALL, A. *et al.* The capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Virulence**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 822–831, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2018.1431087>.

CASADEVALL, A.; ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Current opinion in microbiology**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 354–358, 2000. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s1369-5274\(00\)00103-x](http://dx.doi.org/10.1016/s1369-5274(00)00103-x).

CATALÁN, M.; MONTEJO, J. C. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. **Revista Iberoamericana de Micología**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 39–49, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1130140606700122>.

CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. **Molecular and cellular biology**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 4912–4919, 1994. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/mcb.14.7.4912-4919.1994>.

CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Isolation of the third capsule-associated gene, CAP60, required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, [s. l.], v. 66, n. 5, p. 2230–2236, 1998. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.66.5.2230-2236.1998>.

CHANG, Y. C.; PENOYER, L. A.; KWON-CHUNG, K. J. The second capsule gene of

Cryptococcus neoformans, CAP64, is essential for virulence. **Infection and immunity**, [s. l.], v. 64, n. 6, p. 1977–1983, 1996. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/iai.64.6.1977-1983.1996>.

CHATURVEDI, V.; WONG, B.; NEWMAN, S. L. Oxidative killing of *Cryptococcus neoformans* by human neutrophils. Evidence that fungal mannitol protects by scavenging reactive oxygen intermediates. **Journal of immunology**, [s. l.], v. 156, n. 10, p. 3836–3840, 1996. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8621921>.

CHEN, Y. *et al.* *Cryptococcus neoformans* Infection in the Central Nervous System: The Battle between Host and Pathogen. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 8, n. 10, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/jof8101069>.

CHEN, Y. *et al.* Microevolution of Serial Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *C. gattii*. **mBio**, [s. l.], v. 8, n. 2, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00166-17>.

CHRISMAN, C. J. *et al.* Phospholipids trigger *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement during interactions with amoebae and macrophages. **PLoS pathogens**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. e1002047, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002047>.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard—third edition. CLSI document M27- A3. **CLSI**, 2008. Disponível em: https://clsi.org/media/1461/m27a3_sample.pdf.

DALLAZEN, J. L. *et al.* Pharmacological potential of alkylamides from *Acmella oleracea* flowers and synthetic isobutylalkyl amide to treat inflammatory pain. **Inflammopharmacology**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 175–186, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10787-019-00601-9>.

DECOTE-RICARDO, D. *et al.* Immunomodulatory Role of Capsular Polysaccharides Constituents of *Cryptococcus neoformans*. **Frontiers of medicine**, [s. l.], v. 6, p. 129, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fmed.2019.00129>.

DEL POETA, M. Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic cell**, [s. l.], v. 3, n. 5, p. 1067–1075, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/EC.3.5.1067-1075.2004>.

DENNING, D. W. Echinocandin antifungal drugs. **The Lancet**, [s. l.], v. 362, n. 9390, p. 1142–1151, 2003. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14472-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14472-8).

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging infectious diseases**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 881–890, 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3201/eid0809.020063>.

DOS SANTOS BENTES, A. *et al.* *Cryptococcus gattii* VGII isolated from native forest and river in Northern Brazil. **Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 495–500, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s42770-019-00066-6>.

EISENMAN, H. C. *et al.* The effect of L-DOPA on *Cryptococcus neoformans* growth and gene expression. **Virulence**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 329–336, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4161/viru.2.4.16136>.

ENIOUTINA, E. Y. *et al.* Phytotherapy as an alternative to conventional antimicrobials: combating microbial resistance. **Expert review of clinical pharmacology**, [s. l.], v. 10, n. 11, p. 1203–1214, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/17512433.2017.1371591>.

FABRI, R. L. *et al.* Spilanthol as a promising antifungal alkylamide for the treatment of vulvovaginal candidiasis. **Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, [s. l.], v. 59, n. 12, p. 1210–1224, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myab054>.

FELDMESSER, M.; KRESS, Y.; CASADEVALL, A. Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. **Microbiology**, [s. l.], v. 147, n. Pt 8, p. 2355–2365, 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-147-8-2355>.

FERREIRA, G. F. *et al.* The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, [s. l.], v. 68, n. 8, p. 1801–1811, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt114>.

FILIÚ, W. F. de O. *et al.* Avian habitats as sources of *Cryptococcus neoformans* in the city of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 591–595, 2002. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/jMmLgdJrQYKBnWf7bvqJgyr/abstract/?lang=en&format=html>. Acesso em: 2 jan. 2024.

FRAGER, S. Z. *et al.* *Paramecium* species ingest and kill the cells of the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, [s. l.], v. 48, n. 5, p. 775–779, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3109/13693780903451810>.

FRANCO-PAREDES, C. *et al.* Management of *Cryptococcus gattii* meningoencephalitis. **The Lancet infectious diseases**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 348–355, 2015. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70945-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70945-4).

FRASES, S. *et al.* Capsule of *Cryptococcus neoformans* grows by enlargement of polysaccharide molecules. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 106, n. 4, p. 1228–1233, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0808995106>.

GARCÍA-RODAS, R. *et al.* *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement and cellular gigantism during *Galleria mellonella* infection. **PloS one**, [s. l.], v. 6, n. 9, p. e24485, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0024485>.

GERBER, E. Ueber die chemischen Bestandteile der Parakresse (*Spilanthus*

oleracea, Jacquin). **Archiv der Pharmazie**, [s. l.], v. 241, n. 4, p. 270–289, 1903. Disponível em: https://scholar.archive.org/work/23t43uqgtvaotfttvrosggpq6m/access/ia_file/crossref-pre-1909-scholarly-works/10.1002%252Fardp.19002380308.zip/10.1002%252Fardp.19032410404.pdf.

GUIRAO-ABAD, J. P. *et al.* ROS formation is a differential contributory factor to the fungicidal action of Amphotericin B and Micafungin in *Candida albicans*. **International journal of medical microbiology: IJMM**, [s. l.], v. 307, n. 4-5, p. 241–248, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.03.005>.

GULLO, F. P. *et al.* Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 32, n. 11, p. 1377–1391, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-013-1915-8>.

HALEVA, L. *et al.* The contest of microbial pigeon neighbors: Interspecies competition between *Serratia marcescens* and the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Fungal biology**, [s. l.], v. 124, n. 7, p. 629–638, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2020.03.004>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. [s. l.], 2022. Disponível em: <https://repisalud.isciii.es/handle/20.500.12105/15113>.

HU, G. *et al.* Variation in chromosome copy number influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* and occurs in isolates from AIDS patients. **BMC genomics**, [s. l.], v. 12, p. 526, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-12-526>.

HUANG, Y. *et al.* Gene, virulence and related regulatory mechanisms in *Cryptococcus gattii*. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, [s. l.], v. 54, n. 5, p. 593–603, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3724/abbs.2022029>.

IYER, K. R. *et al.* Treatment strategies for cryptococcal infection: challenges, advances and future outlook. **Nature reviews. Microbiology**, [s. l.], v. 19, n. 7, p. 454–466, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-021-00511-0>.

KASS, L. R. The Antibacterial Activity of 3-Decynoyl-N-acetylcysteamine: INHIBITION IN VIVO OF β -HYDROXYDECANOYL THIOESTER DEHYDRASE. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 243, n. 12, p. 3223–3228, 1968. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925818932965>.

KAVALLIERATOS, N. G. *et al.* *Acmella oleracea* extracts as green pesticides against eight arthropods attacking stored products. **Environmental science and pollution research international**, [s. l.], v. 30, n. 41, p. 94904–94927, 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-023-28577-8>.

KHAN, M. S. A.; AHMAD, I.; CAMEOTRA, S. S. Phenyl aldehyde and propanoids

exert multiple sites of action towards cell membrane and cell wall targeting ergosterol in *Candida albicans*. **AMB Express**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 54, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/2191-0855-3-54>.

KIDD, S. E. *et al.* A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 101, n. 49, p. 17258–17263, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0402981101>.

KURTZMAN, C.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts: A Taxonomic Study**. [S. l.]: Elsevier, 2011. *E-book*. Disponível em: <https://play.google.com/store/books/details?id=yfg79rIIFlkC>.

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHEK, I.; POPKIN, T. J. Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. **Journal of bacteriology**, [s. l.], v. 150, n. 3, p. 1414–1421, 1982. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/jb.150.3.1414-1421.1982>.

LI, Z. *et al.* Solvent extraction of cesium and rubidium from brine solutions using 4-tert-butyl-2-(α -methylbenzyl)-phenol. **Hydrometallurgy**, [s. l.], v. 171, p. 1–7, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304386X16309367>.

LYNCH, A. S.; ROBERTSON, G. T. Bacterial and fungal biofilm infections. **Annual review of medicine**, [s. l.], v. 59, p. 415–428, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.med.59.110106.132000>.

MARTINS, L. M. S. *et al.* Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as agents of endemic cryptococcosis in Teresina, Piauí (northeastern Brazil). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 106, n. 6, p. 725–730, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762011000600012>.

MAY, R. C. *et al.* *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nature reviews. Microbiology**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 106–117, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2015.6>.

MCCONOUGHHEY, S. J. *et al.* Biofilms in periprosthetic orthopedic infections. **Future microbiology**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 987–1007, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.14.64>.

MESA-ARANGO, A. C. *et al.* 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**, [s. l.], v. 58, n. 11, p. 6627–6638, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.03570-14>.

MISSALL, T. A.; CHERRY-HARRIS, J. F.; LODGE, J. K. Two glutathione peroxidases in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* are expressed in the presence of specific substrates. **Microbiology**, [s. l.], v. 151, n. Pt 8, p. 2573–2581, 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.28132-0>.

MISSALL, T. A.; PUSATERI, M. E.; LODGE, J. K. Thiol peroxidase is critical for virulence and resistance to nitric oxide and peroxide in the fungal pathogen, *Cryptococcus neoformans*. **Molecular microbiology**, [s. l.], v. 51, n. 5, p. 1447–1458, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.03921.x>.

MOLINA-TORRES, J. *et al.* Fungistatic and bacteriostatic activities of alkamides from *Heliopsis longipes* roots: affinin and reduced amides. **Journal of agricultural and food chemistry**, [s. l.], v. 52, n. 15, p. 4700–4704, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/jf034374y>.

MOLINA-TORRES, J.; GARCÍA-CHÁVEZ, A.; RAMÍREZ-CHÁVEZ, E. Antimicrobial properties of alkamides present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: affinin and capsaicin. **Journal of ethnopharmacology**, [s. l.], v. 64, n. 3, p. 241–248, 1999. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-8741\(98\)00134-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-8741(98)00134-2).

MONTOYA, M. C.; MAGWENE, P. M.; PERFECT, J. R. Associations between *Cryptococcus* Genotypes, Phenotypes, and Clinical Parameters of Human Disease: A Review. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 7, n. 4, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/jof7040260>.

MORENO, S. C. *et al.* Bioactivity of compounds from *Acmella oleracea* against *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) and selectivity to two non-target species. **Pest management science**, [s. l.], v. 68, n. 3, p. 386–393, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/ps.2274>.

NAKATANI, N.; NAGASHIMA, M. Pungent Alkamides from *Spilanthes acmella* L. var. *oleracea* Clarke. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, [s. l.], v. 56, n. 5, p. 759–762, 1992. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.56.759>.

OLSZEWSKI, M. A. *et al.* Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. **The American journal of pathology**, [s. l.], v. 164, n. 5, p. 1761–1771, 2004. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63734-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63734-0).

O'MEARA, T. R.; ALSPAUGH, J. A. The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield. **Clinical microbiology reviews**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 387–408, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00001-12>.

PARDRIDGE, W. M. Drug Transport across the Blood–Brain Barrier. **Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, [s. l.], v. 32, n. 11, p. 1959–1972, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.126>.

PAULRAJ, J.; GOVINDARAJAN, R.; PALPU, P. The genus *Spilanthes* ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacological properties: a review. **Advances in pharmacological sciences**, [s. l.], v. 2013, p. 510298, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/510298>.

PENK, A.; PITTROW, L. Role of fluconazole in the long-term suppressive therapy of

fungal infections in patients with artificial implants. **Mycoses**, [s. l.], v. 42 Suppl 2, p. 91–96, 1999. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10865912>.

PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. **FEMS yeast research**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 463–468, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00051.x>.

PETTER, R. *et al.* A survey of heterobasidiomycetous yeasts for the presence of the genes homologous to virulence factors of *Filobasidiella neoformans*, CNLAC1 and CAP59. **Microbiology**, [s. l.], v. 147, n. Pt 8, p. 2029–2036, 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-147-8-2029>.

PIPPI, B. *et al.* New insights into the mechanism of antifungal action of 8-hydroxyquinolines. **Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 41–48, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2018.07.017>.

RAJENDRAN, R. *et al.* Isolation and quantification of antimalarial N-alkylamides from flower-head derived in vitro callus cultures of *Spilanthes paniculata*. **Journal of bioscience and bioengineering**, [s. l.], v. 124, n. 1, p. 99–107, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.02.001>.

RAMAGE, G. *et al.* Our current understanding of fungal biofilms. **Critical reviews in microbiology**, [s. l.], v. 35, n. 4, p. 340–355, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3109/10408410903241436>.

RAMAGE, G.; WILLIAMS, C. The clinical importance of fungal biofilms. **Advances in applied microbiology**, [s. l.], v. 84, p. 27–83, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-407673-0.00002-3>.

RIBEIRO, R. A.; BOURBON-MELO, N.; SÁ-CORREIA, I. The cell wall and the response and tolerance to stresses of biotechnological relevance in yeasts. **Frontiers in microbiology**, [s. l.], v. 13, p. 953479, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2022.953479>.

ROLNIK, A.; OLAS, B. The Plants of the Asteraceae Family as Agents in the Protection of Human Health. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 22, n. 6, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22063009>.

RONDANELLI, M. *et al.* *Acmella oleracea* for pain management. **Fitoterapia**, [s. l.], v. 140, p. 104419, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104419>.

RUTHERFORD, J. C. The emerging role of urease as a general microbial virulence factor. **PLoS pathogens**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. e1004062, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1004062>.

SALAZAR-ARANDA, R. *et al.* Antimicrobial and antioxidant activities of plants from northeast of Mexico. **Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM**, [s. l.], v. 2011, p. 536139, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/nep127>.

SANFELICE, F. Contributo alla morfologia e biologia dei blastomiceti che si sviluppano nei succhi di alcuni frutti. **Annali di igiene: medicina preventiva e di comunita**, [s. l.],

SANTI, L. *et al.* Proteomic profile of *Cryptococcus neoformans* biofilm reveals changes in metabolic processes. **Journal of proteome research**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 1545–1559, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/pr401075f>.

SENEVIRATNE, C. J. *et al.* Unraveling the resistance of microbial biofilms: has proteomics been helpful?. **Proteomics**, [s. l.], v. 12, n. 4-5, p. 651–665, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201100356>.

SEVERO, C. B. *et al.* Cryptococcosis in children. **Paediatric respiratory reviews**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 166–171, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prrv.2009.06.009>.

SHARMA, R.; ARUMUGAM, N. N-alkylamides of *Spilanthes* (syn: *Acmella*): Structure, purification, characterization, biological activities and applications – a review. **Future foods: a dedicated journal for sustainability in food science**, [s. l.], v. 3, n. 100022, p. 100022, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666833521000125>.

SHI, M. *et al.* Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. **The Journal of clinical investigation**, [s. l.], v. 120, n. 5, p. 1683–1693, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI41963>.

SHOURIAN, M.; QURESHI, S. T. Resistance and Tolerance to Cryptococcal Infection: An Intricate Balance That Controls the Development of Disease. **Frontiers in immunology**, [s. l.], v. 10, p. 66, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2019.00066>.

SINGH, A. *et al.* Factors required for activation of urease as a virulence determinant in *Cryptococcus neoformans*. **mBio**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. e00220–13, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00220-13>.

SIONOV, E. *et al.* Heteroresistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* is intrinsic and associated with virulence. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, [s. l.], v. 53, n. 7, p. 2804–2815, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00295-09>.

SPADARI, C. de C. *et al.* New Approaches for Cryptococcosis Treatment. **Microorganisms**, [s. l.], v. 8, n. 4, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms8040613>.

SPELMAN, K. *et al.* The traditional medicine *Spilanthes acmella*, and the alkylamides spilanthol and undeca-2E-ene-8,10-dienoic acid isobutylamide, demonstrate in vitro and in vivo antimalarial activity. **Phytotherapy research: PTR**, [s. l.], v. 25, n. 7, p. 1098–1101, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.3395>.

STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus*

neoformans interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 98, n. 26, p. 15245–15250, 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.261418798>.

STONE, N. R. *et al.* Dynamic ploidy changes drive fluconazole resistance in human cryptococcal meningitis. **The Journal of clinical investigation**, [s. l.], v. 129, n. 3, p. 999–1014, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI124516>.

VAN DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, [s. l.], v. 46, n. 11, p. 3394–3400, 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.46.11.3394-3400.2002>.

VARTIVARIAN, S. E. *et al.* Regulation of cryptococcal capsular polysaccharide by iron. **The Journal of infectious diseases**, [s. l.], v. 167, n. 1, p. 186–190, 1993. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/167.1.186>.

VASIREDDY, L.; BINGLE, L. E. H.; DAVIES, M. S. Antimicrobial activity of essential oils against multidrug-resistant clinical isolates of the *Burkholderia cepacia* complex. **PloS one**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. e0201835, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0201835>.

VERYSER, L. *et al.* Mucosal and blood-brain barrier transport kinetics of the plant N-alkylamide spilanthol using in vitro and in vivo models. **BMC complementary and alternative medicine**, [s. l.], v. 16, p. 177, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s12906-016-1159-0>.

WATTERS, C. *et al.* Host Responses to Biofilm. **Progress in molecular biology and translational science**, [s. l.], v. 142, p. 193–239, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.pmbts.2016.05.007>.

WILLIAMSON, P. R. *et al.* Cryptococcal meningitis: epidemiology, immunology, diagnosis and therapy. **Nature reviews. Neurology**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 13–24, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2016.167>.

YANG, S.-K. *et al.* Lavender essential oil induces oxidative stress which modifies the bacterial membrane permeability of carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae*. **Scientific reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 819, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-55601-0>.

ZARAGOZA, O. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. **Virulence**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 490–501, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2019.1614383>.

ZARAGOZA, O. *et al.* Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. **Cellular microbiology**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 2043–2057, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01186.x>.

ZARAGOZA, O.; CASADEVALL, A. Experimental modulation of capsule size in

Cryptococcus neoformans. **Biological procedures online**, [s. l.], v. 6, p. 10–15, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1251/bpo68>.

ZHAO, Y. *et al.* *Cryptococcus neoformans*, a global threat to human health. **Infectious diseases of poverty**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 20, 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s40249-023-01073-4>.