

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO



Dissertação

**Modelo alternativo utilizando meio simulado do fluído espinhal cerebral (FES)
para avaliação da atividade antifúngica de ácidos graxos frente à
Cryptococcus spp.**

Edila Maria Kickhöfel Ferrer

Pelotas, 2018

Edila Maria Kickhöfel Ferrer

**Modelo alternativo utilizando meio simulado do fluído espinhal cerebral (FES)
para avaliação da atividade antifúngica de ácidos graxos frente à
Cryptococcus spp.**

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e
Bioprospecção da Universidade Federal de
Pelotas como requisito parcial a obtenção do
Título de Mestre em Ciências (Bioquímica e
Bioprospecção).

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Vaucher
Coorientador: Prof. Dr. Claudio Martin Pereira de Pereira

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

F386m Ferrer, Edila Maria Kickhöfel

Modelo alternativo utilizando meio simulado do fluído espinhal cerebral (FES) para avaliação da atividade antifúngica de ácidos graxos frente à *Cryptococcus* spp. / Edila Maria Kickhöfel Ferrer ; Rodrigo de Almeida Vaucher, orientador ; Claudio Martin Pereira de Pereira, coorientador. — Pelotas, 2018.

65 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Ácidos graxos alifáticos. 2. *Cryptococcus* spp.. 3. Fluído espinhal simulado. 4. Atividade antifúngica. I. Vaucher, Rodrigo de Almeida, orient. II. Pereira, Claudio Martin Pereira de, coorient. III. Título.

CDD : 574.192

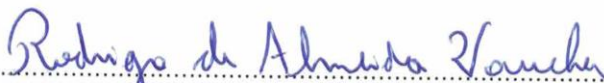
Edila Maria Kickhöfel Ferrer

**Modelo alternativo utilizando meio simulado do fluído espinhal cerebral (FES)
para avaliação da atividade antifúngica de ácidos graxos frente à
Cryptococcus spp.**

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção), Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 28/09/2018

Banca examinadora:



Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Vaucher (Orientador)
Doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Profª. Drª Camila Belmonte Oliveira
Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria



Profª. Drª Janice Luehring Giongo
Doutora em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Agradecimentos

Agradeço a Deus por me dar saúde, força e coragem para enfrentar todos os momentos difíceis e por todas as graças recebidas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Vaucher, pela oportunidade e, principalmente, pelos ensinamentos transmitidos.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Claudio M. P. Pereira.

Ao grupo LaPeBBioM.

À professora e amiga Giana de Paula Cognato, por ter me apresentado ao mundo da Pós-Graduação.

Às professoras Juliana Bidone e Rejane Giacomelli Tavares, pelo carinho e incentivo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, pela oportunidade.

Às minhas amigas de trabalho Cristiane Degen Chagas e Vanize Mackedanz Lüdtke, que me apoiaram em todos os momentos.

Ao meu marido, pelo apoio, compreensão e incentivo para que eu não desistisse dos meus sonhos.

A todas demais pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, meu muito obrigada.

Resumo

FERRER, Edila Maria Kickhöfel. **Modelo alternativo utilizando meio simulado do fluído espinhal cerebral (FES) para avaliação da atividade antifúngica de ácidos graxos frente à *Cryptococcus* spp.** 2018. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A pesquisa de novos métodos para investigar a capacidade de crescimento de espécies de fungos do gênero *Cryptococcus* é de fundamental importância na avaliação de novos compostos bioativos, como por exemplo, os ácidos graxos alifáticos. Um modelo que já foi proposto para mimetizar as condições do líquido cefalorraquidiano (LCR) foi o fluído espinhal cerebral simulado (FES), que surge como uma alternativa interessante. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antifúngica de ácidos graxos alifáticos frente a espécies de *Cryptococcus* utilizando o modelo FES. A atividade antioxidante dos ácidos graxos alifáticos foi avaliada usando o ensaio FRAP. A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) de cada ácido foram determinadas frente a isolados ambientais e a cepas de *C. neoformans*, *C. grubii* e *C. gattii*. A atividade antifúngica também foi avaliada *in vitro* no FES após inoculação dos fungos. As atividades dos ácidos foram monitoradas pelas curvas de crescimento fúngico e a determinação dos níveis de glicose e proteína totais. Os ácidos graxos apresentaram uma melhor atividade antioxidante do que a vitamina C. Os valores CIM e CFM avaliados nos diferentes fungos foram: ácido cáprico 0,19-0,80 e 0,75-3,04, ácido láurico 0,09-0,80 e 0,19-0,80, ácido caprílico 1,50-6,04 e 0,19-0,80 e ácido undecilênico 0,38-2,94 e 0,38-5,89µg/µL, respectivamente. O crescimento de *Cryptococcus* spp. no FES foi satisfatório, sendo observado um aumento significativo no número de log UFC/ml no período de cultura de 72 horas. Apenas o ácido láurico foi capaz de inibir o crescimento das três espécies diferentes de *Cryptococcus* nas concentrações testadas. Os níveis de glicose para *C. neoformans* reduziram significativamente no tratamento com ácido láurico. Na concentração de 2x CIM, os níveis de glicose foram significativamente reduzidos para o *C. grubii*, e também para o tratamento com ácido láurico 2x CIM em 24 horas e ácido cáprico a 48 horas nesta concentração. Para *C. gattii*, os níveis de glicose foram reduzidos significativamente um período de 48 horas para o tratamento com ácido láurico, ácido cáprico a ½ CIM, CIM e 2x CIM e ácido undecilênico na concentração de 2x CIM em 48 horas. Contudo, não foi observada a redução significativa dos níveis de proteína nas concentrações e tempos testados. Os resultados observados com a aplicação do modelo FES inoculado com espécies de *Cryptococcus* foi capaz de demonstrar a atividade antifúngica *in vitro* de ácidos graxos alifáticos. Portanto, o modelo FES pode ser considerado uma alternativa interessante para o estudo de compostos bioativos no LCR.

Palavras-chave: ácidos graxos alifáticos; *Cryptococcus* spp.; fluído espinhal simulado; atividade antifúngica.

Abstract

FERRER, Edila Maria Kickhöfel. **Alternative model using simulated spinal fluid (SSF) medium to evaluate the antifungal activity of fatty acids against *Cryptococcus* species.** 2018. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The research of new methods to evaluate the growth capacity of *Cryptococcus* fungi species is of fundamental importance for the evaluation of new bioactive compounds, e.g; including; such as aliphatic fatty acids. A model that has already been proposed to mimic the conditions of the CSF was the simulated spinal fluid (SSF) that emerges as an interesting alternative. The objective of this study was to evaluate the antifungal activity of aliphatic fatty acid against *Cryptococcus* species using the simulated spinal fluid model (SSF). The antioxidant activity of aliphatic fatty acid was evaluated using FRAP assay. MIC and MFC of each acid were determined environmental isolates and strains of *C. neoformans*, *C. grubii* and *C. gattii*. Antifungal activity was also evaluated *in vitro* in SSF inoculated with fungi. Acids activities were monitored by fungal growth curve and determination of glucose and protein levels. Fatty acids display a better antioxidant activity than vitamin C. MIC and MFC values evaluated in the different fungi were: capric acid 0.19 - 0.80 and 0.75 - 3.04, lauric acid 0.09 - 0.80 and 0.19 - 0.80, caprylic acid 1.50 - 6.04 and 0.19 - 0.80 and undecylenic acid 0.38 - 2.94 and 0.38 - 5.89 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, for each fatty acid, respectively. The growth of *Cryptococcus* species in SSF was satisfactory being observed significantly increased the log CFU mL^{-1} number in the 72 hour culture period. Only lauric acid was able to inhibit the growth of the three different species of *Cryptococcus* at the tested concentrations. Levels of glucose for *C. neoformans* significantly reduced in lauric acid treatment. At 2x MIC glucose levels were significantly reduced for *C. grubii*, in lauric acid treatment at 2x MIC in 24 hour and capric acid at 48 hour at this concentration. For *C. gattii*, glucose levels were significantly reduced a period of 48 hours in lauric acid treatment, capric acid at $\frac{1}{2}$ MIC, MIC and 2x MIC and undecylenic acid at the concentration of 2x MIC at all time of 48 hours, but it did no show significant reduction of protein levels at the times tested. The results observed with the application of the SSF model inoculated with *Cryptococcus* species were able to demonstrate the *in vitro* antifungal activity of aliphatic fatty acids. Therefore, the SSF model can be considered an interesting alternative for the study of CSF-like bioactive compounds.

Key-words: aliphatic fatty acids; *Cryptococcus* species; simulated spinal fluid, antifungal activity.

Lista de Figuras

Revisão Bibliográfica

Figura 1: Interações de células fúngicas com células fagocíticas e disseminação de fungos através da barreira hematoencefálica..... 17

Figura 2: Cápsula polissacarídea presente nas espécies de *Cryptococcus* após exame direto com tinta nanquim..... 19

Figura 3: Processo de formação do LCR 21

Figura 4: Halos de *C. neoformans*. Leveduras em brotamento rodeadas de halo capsulados transparente (cápsula polissacarídea). Coloração por tinta da China 24

Figura 5: Representação esquemática de uma célula criptocócica, mostrando principais alvos terapêuticos atuais que atuam em cada sítio 26

Manuscrito: **Fig. 1.** Antioxidant activity of aliphatic fatty acid were measured by ferric reducing/antioxidant power and expressed as FRAP ($\mu\text{mol L}^{-1}$). Values are mean $\pm$ S.D. indicate statistical differences compared to one-way ANOVA followed by Dunnett test at $p < 0,01$ (**) when groups were compared to Vitamin C (Vit C) 41

Manuscrito: **Fig. 2.** Growth of the *Cryptococcus* species in the SSF. Values represent the mean $\pm$ S.D ($\log \text{CFU mL}^{-1}$) and indicate statistical differences compared to one-way ANOVA followed by Dunnett test at $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**) when groups were compared to fungal control at time 0..... 42

Manuscrito: **Fig. 3.** Glucose and protein levels in the SSF determined during the growth of fungal *C. neoformans* in the different concentrations of fatty acids and times tested. Values represent the mean $\pm$ SD (mg dL^{-1}) and indicate statistical differences compared to one-way ANOVA followed by Dunnett test at $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**) when groups were compared to fungal control at Amphotericin B (AmpB). Fungal control (FC) 44

Manuscrito: **Fig. 4.** Glucose and protein levels in SSF determined during growth of fungal *C. grubii* at different concentrations of fatty acids and times tested. Values represent the mean $\pm$ SD (mg dL⁻¹) and indicate statistical differences compared to one-way ANOVA followed by Dunnett test at p <0.05 (*) and p <0.01 (**) when groups were compared to fungal control at Amphotericin B (AmpB). Fungal control (FC)..... 45

Manuscrito: **Fig. 5.** Glucose and protein levels in SSF determined during *C. gattii* fungal growth at different concentrations of fatty acids and times tested. Values represent the mean $\pm$ SD (mg dL⁻¹) and indicate statistical differences compared to one-way ANOVA followed by Dunnett test at p <0.05 (*) and p <0.01 (**) when groups were compared to fungal control at Amphotericin B (AmpB). Fungal control (FC)..... 46

Lista de Tabelas

Revisão Bibliográfica

Tabela 1: Estrutura dos ácidos alifáticos testados.27

Manuscrito: **Table 1:** Structure of tested aliphatic fatty acids... ..38

Manuscrito: **Table 2:** Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of the aliphatic fatty acid against *Cryptococcus spp.* estimated by the microdilution method 42

Manuscrito: **Table 3:** Antifungal activity of the different concentrations ($\frac{1}{2}$ MIC, MIC and 2x MIC) of the fatty acids against the species of *Cryptococcus*..... 43

Lista de Abreviaturas e Siglas

AGs	Ácidos Graxos
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> (Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida)
AFLP	<i>Amplified-fragment Length Polymorphism</i>
AMB	Anfotericina B
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CGB	Canavanina-glicina-azul de bromotimol
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
FES	Fluído Espinhal Cerebral Simulado
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> (Poder Antioxidante de Redução do Ferro)
GXM	Glucuronoxilomanana
HIV	<i>Human Immunodeficient Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
M27-A2	Métodos de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade à Terapia Antifúngica das Leveduras
MCAD	Deficiência de Acil-CoA Desidrogenase de Cadeia Média
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
UFC	Unidade Formadora de Colônias
var	Variedade

Sumário

1 Introdução	11
2 Objetivos	13
Objetivo Geral	13
Objetivos Específicos	13
3 Revisão Bibliográfica	14
O gênero <i>Cryptococcus</i>	14
Principais Fatores de Virulência	18
Cápsula Polissacarídea	18
Produção de Melanina	19
Produção de Enzimas Urease, Fosfolipase e Proteinase	20
Termotolerância	21
Sistema Nervoso Central e o Líquido Cefalorraquidiano	21
Meningite Criptocócica	22
Diagnóstico Laboratorial	22
Microbiológico	23
Bioquímico	25
Tratamento	26
Atividade Antimicrobiana dos Ácidos Graxos	27
Mecanismo de Ação dos Ácidos Graxos	30
Atividade Antioxidante dos Ácidos Graxos	31
Fluído Espinhal Simulado	31
4 Manuscrito	33
5 Conclusão	55
Referências	56
Anexo	64
Anexo A – Comprovante de submissão do manuscrito a Revista <i>Microbial Pathogenesis</i>	65

1 Introdução

As doenças infecciosas representam um problema crítico para a saúde e continuam sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. A maioria das mortes que afetam pacientes imunossuprimidos é atribuída, principalmente, a fungos invasivos, pertencentes aos gêneros *Candida*, *Aspergillus* e *Cryptococcus*. Destas espécies, os principais agentes patogênicos fúngicos incluem *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans* (BONGOMIN et al., 2017; IKEH, AHMED e QUINN, 2017).

Nos últimos anos, tem aumentado a incidência de infecções fúngicas oportunistas fatais, como a criptococose. Isso pode ser devido ao crescimento da população imunocomprometida como aos submetidos a tratamento quimioterápico, aos transplantados de órgãos sólidos e, principalmente, a pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS/HIV) (PERFECT e BICANIC, 2015).

A meningite criptocócica é a manifestação mais grave da criptococose, cujos principais agentes causadores são os fungos saprófitas ambientais *C. neoformans* e *C. gattii* (MAZIARZ e PERFECT, 2016). A infecção se dá pela inalação de propágulos de esporos do fungo dispersos no ambiente contaminado, afetando os pulmões, resultando em infecção primária (VELAGAPUDI et al., 2009) e a sua disseminação através da corrente sanguínea alcança o sistema nervoso central (SNC), causando a meningoencefalite (IKEH, AHMED e QUINN, 2017; TREVIJANO-CONTADOR et al., 2017).

A terapia atualmente empregada para o tratamento da criptococose consiste na administração combinada ou individual de polienos (anfotericina B – AmB e seus derivados lipossômicos), de azóis (cetoconazol, itraconazol, fluconazol e voriconazol) e de um análogo de pirimidina (5-flucitosina – 5-FC) entre outros (WILLIAMSON et al., 2016). No entanto, essas opções terapêuticas são limitadas à resistência dos micro-organismos patogênicos (KANAFANI e PERFECT, 2008; SANGLARD, 2016) e também a sua toxicidade (PERFECT e BICANIC, 2015; WILLIAMSON et al., 2016).

Devido à gravidade da enfermidade quanto à virulência dos fungos causadores, a sua resistência aos fármacos usados no tratamento e à toxicidade destes, tem aumentado o interesse científico na busca por novos agentes terapêuticos para o tratamento. Uma alternativa interessante que tem sido investigada como um agente antifúngico são os ácidos graxos (AGs). Estudos demonstram que os AGs apresentam uma série de vantagens sobre os antifúngicos convencionais, tais como: menor citotoxicidade, menor risco de contaminação ambiental, maior biodegradabilidade e biocompatibilidade (DESBOIS e SMITH, 2010; POHL, KOCK e THIBANE, 2011; SHI et al., 2016).

Souza et al. (2014) investigaram a atividade antifúngica *in vitro*, a produção de exoenzimas e a citotoxicidade de alguns AGs alifáticos e seus derivados ésteres contra espécies de *Candida*. Neste estudo, os autores avaliaram a atividade antifúngica de AGs (ácido caprílico, cáprico, láurico e mirístico) e observaram que o ácido láurico apresentou melhor atividade contra as espécies deste fungo. Os autores observaram uma inibição significativa na produção de fosfolipase, após a adição de AGs. Além disso, testes utilizando AGs revelaram uma viabilidade celular de 80%, demonstrando uma potencial aplicabilidade dessas moléculas como antifúngico. Além disso, poucos estudos têm sido propostos para avaliar a atividade antifúngica de AGs contra fungos do gênero *Cryptococcus* (HUANG et al., 2011; TAKAHASHI et al., 2012; PEREIRA et al., 2016; PETROVIĆ et al., 2018).

O uso de um modelo *in vitro* que corresponde às condições de crescimento do fungo *Cryptococcus* spp. no líquido cefalorraquidiano (LCR) é considerado de fundamental importância para a avaliação antifúngica de novos compostos bioativos. Um modelo proposto foi o modelo de fluído espinhal cerebral simulado (FES) que surge como uma alternativa interessante e pode ser usado para este fim. Neste modelo, é possível imitar as características físico-químicas do LCR (LOFSNESS e JENSEN, 1983). O modelo pode fornecer as condições necessárias para o crescimento fúngico e avaliação das características bioquímicas presentes no fluído após inibição ou crescimento do fungo. No entanto, não há literatura sobre o uso deste modelo para avaliar a atividade antifúngica dos AGs, o que torna este trabalho relevante.

2 Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar a atividade antifúngica de AGs, *in vitro*, utilizando meio simulado do fluído espinhal cerebral (FES), frente a isolados ambientais de *Cryptococcus* spp.

Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade antioxidante dos compostos a serem testados utilizando o ensaio FRAP.
- Determinar a Concentração Mínima Inibitória (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos AGs sobre o *Cryptococcus* spp.
- Determinar a Concentração Mínima Inibitória (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos AGs sobre o *Cryptococcus* spp. utilizando como meio o FES.
- Realizar determinações bioquímicas dos níveis de glicose, proteínas totais e após tratamento com os compostos escolhidos a partir das CIM no FES.

3 Revisão Bibliográfica

O gênero *Cryptococcus*

O *Cryptococcus* spp. é um fungo de levedura encapsulado, mundialmente distribuído, pertencente à classe Basidiomiceto. Por sua característica saprófita, pode ser encontrado disperso em diversos substratos ambientais, alimentando-se dos nutrientes encontrados no solo, em plantas, em resíduos vegetais e excretas de aves (ARAÚJO JÚNIOR et al, 2017). Atualmente são reconhecidas mais de 70 espécies de *Cryptococcus* spp. (KWON-CHUNG et al., 2014). No entanto, somente duas espécies, o *C. neoformans* e o *C. gattii*, são consideradas os principais agentes etiológicos responsáveis pelas manifestações clínicas mais severas da criptococose, como a meningite ou meningoencefalite criptocócica de evolução grave e fatal, podendo ser acompanhada de lesão pulmonar, fungemia e focos secundários para pele, ossos, rins entre outros (KON et al., 2008; KWON-CHUNG et al., 2014; MAZIARZ e PERFECT, 2016).

A criptococose é uma micose de natureza sistêmica que acomete tanto a seres humanos quanto a animais domésticos e silvestres. É causada pelo fungo mundialmente reconhecido como patologicamente oportunista do gênero *Cryptococcus* (GILES et al., 2009; PAL, TESFAYE e DAVE, 2014; MÜLLER e NISHIZAWA, 2017). É uma micose aguda, subaguda ou crônica de importância mundial, também conhecida como doença de Busse-Buschke, blastomicose européia, meningite por *Torula*, *Torulose*. O *C. neoformans* foi descoberto por volta de 1894 na Itália por Sanfelice a partir do isolamento no suco de pêssago e no mesmo ano, na Alemanha, Otto Busse isolou essa levedura a partir de um sarcoma em uma lesão da tíbia e outras lesões cutâneas em uma mulher (PAL, TESFAYE e DAVE, 2014).

O *C. neoformans* pode ser encontrado, principalmente, em excrementos de pássaros, especialmente de pombos domésticos, possivelmente, por serem ricos em nutrientes (nitrogênio, creatina e sais). É considerado o principal causador de morte por criptococose pelo acometimento do SNC. Entretanto, o *C. gattii* está relacionado, principalmente, à madeira em decomposição de certas plantas, como a *Eucalyptus* spp. das zonas tropicais e subtropicais, e associado às mortes por falência da

função respiratória por lesões pulmonares em pacientes presumidamente imunocompetentes (CORREA et al., 2017). Muito embora também tenha sido encontrado em diferentes regiões geográficas do mundo e associado a diferentes plantas, inclusive no Brasil (BALTAZAR e RIBEIRO, 2008).

Devido à característica cosmopolita de *C. neoformans* e *C. gattii*, é estimada a essas espécies, como sendo causadoras de mais de um milhão de novos casos de criptococose por ano, com altas taxas de morbidade e mortalidade associadas, principalmente, a pacientes imunocomprometidos infectados pelo vírus HIV (MAZIARZ e PERFECT, 2016), especialmente em países de recursos limitados como a África Subsaariana, o sul e sudeste da Ásia (RAJASINGHAM et al., 2017). Firacative et al. (2018), em trabalho recente, refere a situação atual do problema, demonstrando a alta incidência de casos de meningite criptocócica associadas a pacientes com HIV, em diversos Estados do Brasil e demais países da América Latina.

Morfologicamente, as leveduras de *C. neoformans* e *C. gattii* são de tamanhos variados e apresentam formatos esféricos a ovalados de 3 a 8µm de diâmetro, com brotamento único ou múltiplo, de colo estreito. A partir do terceiro dia de cultivo à temperatura de 25 a 37°C e cultivados em meios apropriados como ágar Sabouraud dextrose (ASD) ou ágar extrato de malte e levedura, formam-se colônias de cor branca a creme, brilhantes, de textura mucóide, margem lisa e inteira (MÜLLER e NISHIZAWA, 2017). O elemento capsular é dependente das condições ambientais, podendo aumentar de tamanho quando cultivado em condições especiais (MITCHELL e PERFECT, 1995; ZARAGOZA, FRIES e CASADEVALL, 2003; ZARAGOZA, 2009). No entanto, em condições naturais, podem apresentar-se pouco desenvolvidas (SORREL e ELLIS, 1997).

A reprodução do fungo pode acontecer tanto pelo de ciclo sexuado quanto pelo assexuado. A reprodução assexuada das espécies de *C. neoformans* e *C. gattii* ocorre, mais frequentemente, no meio ambiente e no hospedeiro, realizando assim, a divisão por brotamento (mitótica), dando origem a duas células independentes, aumentando rapidamente o número de leveduras (LIN e HEITMAN, 2006). Durante a reprodução sexuada, o *Cryptococcus* spp. pode formar hifas verdadeiras. No entanto, a sua condição de fungo dimórfico não é considerada verdadeira, uma vez

que a fase filamentosa é apenas transitória, surgindo após fusão entre dois tipos sexuais *mating types* (*MAT α* e *MATa*), resultando no estágio sexuado teleomorfo basidiomiceta do fungo denominado *Filobasidiella* spp. A *F. neoformans* corresponde ao *C. neoformans* e a *F. bacillispora* corresponde ao *C. gattii* (KWON-CHUNG, 1975; MITCHELL e PERFECT, 1995; SORRELL e ELLIS, 1997).

A diferenciação do complexo *C. neoformans* se produz de acordo com suas classificações sorológicas através dos diferentes antígenos polissacarídeos capsulares. O *C. neoformans*, que normalmente acomete pacientes com a imunidade comprometida, possui três variedades: *C. neoformans* var. *grubii*, pertencente ao sorotipo A; *C. neoformans* var. *neoformans*, pertencente ao sorotipo D; e um híbrido, pertencente ao sorotipo AD (var. *neoformans* e *grubii*). O *C. gattii*, pertencente ao sorotipo B e C, está relacionado a hospedeiros aparentemente imunocompetentes (MAZIARZ e PERFECT, 2016).

Essas espécies também são classificadas em diferentes tipos moleculares. *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) é classificado em AFLP1/VNI e AFLP1A/VNII, AFLP3/VNIII (sorotipo AD) e AFLP2/VNIV (sorotipo D). Já o *C. gattii* é classificado em AFLP1/VIG, AFLP6/VGII, AFLP5/VGIII e AFLP7/AFLP10/VGIV (sorotipos B e C), pertencentes às espécies *C. bacillisporus*, *C. deuterogattii*, *C. tetragattii* e *C. decagattii* (ESPINEL-INGROFF et al., 2012; HAGEN et al., 2015; MAZIARZ e PERFECT, 2016). A diferença entre os tipos moleculares das espécies pode estar relacionada às diferenças de sensibilidade aos antifúngicos (ESPINEL-INGROFF et al., 2012).

Kwon-Chung e Varma (2006) observaram que existem algumas características morfológicas especificamente associadas a cada uma das duas espécies, tais como: as colônias de *C. gattii* cultivadas em ágar micológico convencional normalmente são mais mucosas e pegajosas do que as de *C. neoformans*, o que nem sempre reflete o tamanho de suas cápsulas; o pigmento marrom produzido por colônias de *C. gattii* é menos intenso que o do *C. neoformans* quando cultivados em meios com substratos fenólicos definidos como L-dopa, ágar semente de níger, ágar semente de girassol, ágar semente de alpiste, ágar caféico entre outros. Além disso, as células de *C. gattii* são mais frequentemente relatadas como elípticas, o que é raramente observada em *C. neoformans*. As duas espécies,

no entanto, podem ser distinguidas de forma mais confiável pelo seu fenótipo de crescimento em certas formulações de meios com base em suas diferenças bioquímicas. As cepas de *C. neoformans* não reagem ao ágar Canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB), enquanto as de *C. gattii* reagem positivamente, dada a sua capacidade de utilizar glicina como única fonte de nitrogênio e carbono e são resistentes a L-canavanina (um análogo da arginina) (KWON-CHUNG e VARMA, 2006).

A principal forma de contágio do hospedeiro pelo *Cryptococcus* ocorre pela inalação dos esporos dispersos no ambiente contaminado, afetando os pulmões, resultando em infecção primária. Nos casos mais graves, o fungo forma granulomas pulmonares ou linfáticos, desenvolvendo uma infecção latente e a sua capacidade de se reproduzir no interior de macrófagos o ajuda a penetrar na corrente sanguínea, disseminando-se para outros tecidos e afetando diversos órgãos como a pele, próstata, olhos e ossos e/ou articulações. No entanto, apresenta grande propensão a estabelecer doença clínica no SNC, podendo levar a meningoencefalite (infecção secundária), geralmente fatal (PERFECT e BICANIC, 2015; IKEH, AHMED e QUINN, 2017; TREVIJANO-CONTADOR et al., 2017).

A entrada da levedura para o SNC pode ocorrer tanto pelo cruzamento direto dos pequenos capilares da barreira hematoencefálica (BHE), quanto pelo extravasamento direto, transcitose endotelial ou pode cruzar no interior de fagócitos mononucleares como um cavalo de Tróia (KRONSTAD et al., 2011; MAY, 2016) (Figura 1).

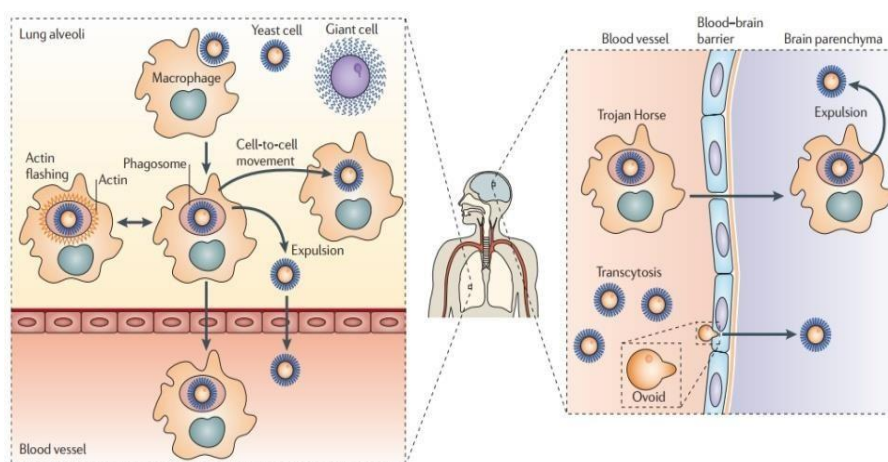


Figura 1: Interações de células fúngicas com células fagocíticas e disseminação de fungos através da barreira hematoencefálica. (Fonte: Kronstad et al., 2011).

Principais Fatores de Virulência

Os fatores de virulência, tais como a cápsula polissacarídea, a produção de melanina através de uma lacase, a capacidade de crescimento a 37°C e as atividades enzimáticas da urease, fosfolipase e proteinases são condições essenciais ao *C. neoformans* e ao *C. gattii* para o estabelecimento da infecção no hospedeiro suscetível a infecções (KRONSTAD, JUNG e HU, 2008; PERFECT e BICANIC, 2015), especialmente se a imunidade específica das células T estiver comprometida (BICANIC e HARRISON, 2005). Tais fatores auxiliam no tropismo do fungo ao SNC, promovendo a invasão, sobrevivência e multiplicação no hospedeiro (MAY et al., 2016).

Cápsula Polissacarídea

De acordo com Maziarz e Perfect (2016), a capacidade de formação da cápsula polissacarídea como fator de virulência é característica das espécies *Cryptococcus*. Confere à levedura propriedades físicas, bioquímicas e imunológicas, favorecendo a adaptação durante a infecção, tais como: antigenicidade e resistência à fagocitose mediada por monócitos, macrófagos e neutrófilos, acarretando considerável redução da apresentação de antígenos nas células T, resultando em uma baixa na resposta imunológica (KWON-CHUNG e RHODES, 1995; KRONSTAD, JUNG e HU, 2008; MAY et al., 2016). No ambiente natural, a cápsula protege o micro-organismo contra algumas condições de estresse, como a desidratação (ZARAGOZA et al, 2009).

A cápsula é constituída, pela sua natureza polissacarídea, por manose, xilose, galactose, ácido glucurônico e um grupo O-acetil, formando um complexo ácido e altamente viscoso, denominado glucuronoxilomanana (GXM), seu constituinte majoritário, seguido pela galactoxilomanana e manoproteínas. O teor de água corresponde a 99% de seu peso total (ZARAGOZA et al., 2009; TREVIJANO-CONTADOR et al., 2017). A cápsula também é responsável pela classificação sorológica das espécies, refletindo as diferenças antigênicas do principal polissacarídeo capsular, a GXM (FRANZOT, SALKIN, CASADEVALL, 1999). Na figura 2 podemos observar a presença de cápsula polissacarídea do fungo *Cryptococcus*, evidenciada na coloração direta com tinta nanquim.

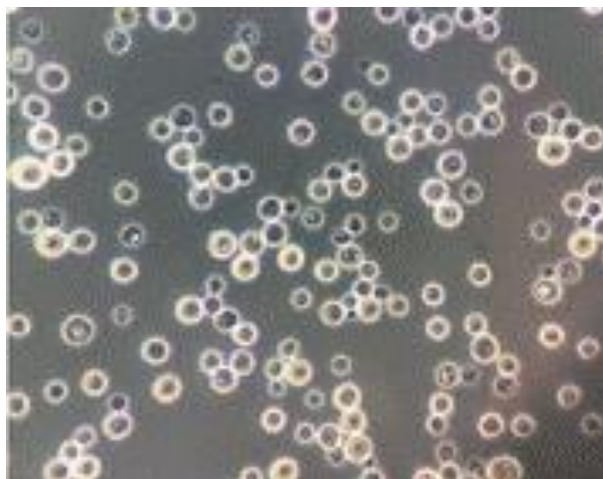


Figura 2: Cápsula polissacarídea presente nas espécies de *Cryptococcus* após exame direto com tinta nanquim (Adaptado de Recio & Perez-Ayala, 2018).

As dimensões da cápsula variam sob determinadas condições de crescimento. São relativamente pequenas quando cultivadas em laboratório ou quando estão em seu ambiente natural, como o solo, cujo tamanho ($<3\mu\text{m}$ de diâmetro) é compatível para serem depositadas em alvéolos pulmonares após a inalação (SORRELL e ELLIS, 1997). No entanto, quando instaladas no hospedeiro e em função das condições especiais encontradas, como a concentração de CO_2 , soro e limitações de ferro, resultam no aumento da cápsula (ZARAGOZA et al, 2009).

Produção de Melanina

Segundo Wang, Aisen e Casadevall (1995), pigmentos de melanina fazem parte da natureza e são produzidos por uma variedade de organismos, incluindo bactérias, fungos, plantas e animais. As moléculas das melaninas são polianiónicas insolúveis e contêm populações estáveis de radicais livres. O pigmento melanínico fica localizado na parede celular do *Cryptococcus* spp., contribuindo para manter a integridade da membrana. A capacidade de produção de melanina ou melinização confere a levedura proteção contra reações oxidativas, atuando na defesa contra radiação UV e ação antifagocítica (MCFADDEN e CASADEVALL, 2001). Em *C. neoformans* e *C. gattii*, a síntese de pigmentos semelhantes à melanina é catalisada por uma fenoloxidase, a lacase (CNLAC1) (WANG, AISEN e CADADEVALL, 1995). De acordo com Bicanic e Harrison (2005), a produção de

melanina a partir de l-dopa pela enzima lacase pode ser responsável pela predileção do fungo pelo SNC.

Produção de Enzimas Urease, Fosfolipase e Proteinase

A produção de enzimas como a urease, fosfolipase e proteinase pelos fungos do complexo *C. neoformans* é uma característica que normalmente os associam a sua capacidade de virulência (KWON-CHUNG et al., 1987; CHEN, BLANK e CASADEVALL, 1996; COX et al., 2000; COX et al., 2001).

A atividade da urease é uma das propriedades bioquímicas mais importantes tanto para o *Cryptococcus* spp. quanto para outras leveduras basidiomicetas (KWON-CHUNG et al., 1987). A urease é uma metaloenzima que catalisa a hidrólise da ureia em amônia e carbamato, fornecendo fontes de nitrogênio (COX et al., 2000).

A migração do fungo para o tecido cerebral é um processo ativo, pois ocorre com células fúngicas vivas e é dependente da secreção da enzima urease. Possivelmente, isso ocorre pela atuação local da urease, que libera a amônia que é tóxica para as células de mamíferos, enfraquecendo barreiras epiteliais, facilitando a entrada do fungo (MAY et al., 2016).

As fosfolipases são enzimas que têm a capacidade de hidrolisar as ligações ésteres dos fosfolipídios, presentes na membrana celular do hospedeiro, causando a desestabilização e degradação e, conseqüentemente, promovendo a lise celular (COX et al., 2001). A atividade da fosfolipase de várias cepas de *C. neoformans* foi observada pela formação de um halo de precipitação ao redor das colônias em meio ágar gema de ovo, bem como a sua formação mais significativa a isolados clínicos quando comparados a isolados ambientais (GHANNUM, 2000).

As proteinases têm demonstrado importância na virulência de micro-organismos patogênicos por serem as responsáveis pela hidrólise das proteínas do hospedeiro, atuando no colágeno, elastina, fibrinogênio, imunoglobulina e nos fatores do complemento, provocando danos teciduais e se favorecendo dos nutrientes e, assim, comprometendo o sistema de defesa do hospedeiro (CHEN, BLANK e CASADEVALL, 1996).

Termotolerância

A capacidade de crescer a temperatura fisiológica de 37 °C é uma condição essencial ao micro-organismo patogênico para se desenvolver no hospedeiro humano. O melhor exemplo que sustenta a importância da termotolerância para a virulência é visto no gênero *Cryptococcus*, implicando as duas espécies patogênicas a humanos em virtude de sua capacidade de crescer a 37 °C (PERFECT, 2006; CHATTERJEE e TATU, 2017). Possivelmente essa habilidade pode estar relacionada ao uso de certos genes como *CNA1*, que codifica a subunidade catalítica A da calcineurina. Esta enzima ativada pelo cálcio e pela calmodulina pode ser responsável pela adaptação, reprodução sexual e sobrevivência ao estresse da exposição a altas temperaturas e, em particular, ao ambiente hospedeiro dos mamíferos (PERFECT, 2006, PARK et al., 2016).

Sistema Nervoso Central e o Líquido Cefalorraquidiano

O SNC é envolvido por membranas conjuntivas denominadas meninges: dura-máter, aracnóide e pia-máter. O LCR ou líquor é um fluido biológico, que permeia intimamente o SNC protegendo e regulando a fisiologia neurológica (SAKKA, COLL e CHAZAL, 2011). Esse fluído aquoso circula pelo espaço intracraniano, preenchendo o sistema ventricular, o canal central da medula e os espaços subaracnóides craniano e raquiano, representando a maior parte do fluído extracelular do SNC e nutrindo o cérebro (COMAR et al., 2009) (Figura 3).



Figura 3: Processo de formação do LCR.

O LCR é uma secreção ativa cujo volume diário produzido em humanos adultos é de 500 a 600ml. A composição do líquido quando comparado a um ultrafiltrado de plasma contém 99% de água e maior concentração de magnésio e de íons de cloretos e menor concentração de glicose, proteínas, aminoácidos, cálcio, fosfato (JOHANSON et al., 2008).

O exame do LCR é frequentemente o elemento determinante para o diagnóstico não somente de doenças do sistema nervoso, como doenças inflamatórias, desmielinizantes, neoplásicas e degenerativas como também de infecções que produzem meningites bacterianas agudas, meningoencefalite herpética, neurotuberculose, neurocisticercose, neurosífilis e neurocriptococose, que possuem a capacidade de alterar composição e produção do líquido (MACHADO, LIVRAMENTO, VIANNA, 2013).

Meningite Criptocócica

A meningite criptocócica afeta principalmente pessoas com sistema imunológico enfraquecido devido a outra doença. O *Cryptococcus*, uma vez instalado no SNC, pode causar meningite criptocócica, uma inflamação que ocorre nas leptomeninges – membranas que envolvem o encéfalo e a medula espinhal – e no LCR presente no espaço subaracnóideo (BICANIC e HARRISON, 2005). A subsequente invasão do encéfalo leva à destruição do tecido, resultando uma série de complicações; dependendo de o tratamento ser imediato ou tardio, podem resultar sequelas neurológicas duradouras e pode ser fatal (ZUNT e BALDWIN, 2012). Os sintomas mais típicos incluem dor de cabeça, náuseas e vômitos, fadiga, confusão ou alucinações, alterações de personalidade, sensibilidade à luz, febre, rigidez do pescoço, visão embaçada (BICANIC e HARRISON, 2005; SABIITI e MAY, 2012; WILLIAMSON et al., 2016).

Diagnóstico Laboratorial

O LCR é o material biológico mais comumente utilizado no diagnóstico para a maioria dos casos diagnosticados de criptococose, uma vez que essa micose compromete o SNC. O LCR pode ser obtido por punção lombar ou cisternal (MACHADO, LIVRAMENTO, VIANNA, 2013). A dosagem de proteína tende a ser

moderadamente elevada e a glicose diminuída. No entanto, a pressão liquórica pode ser normal ou um pouco elevada (SEEHUSEN, REEVES e FOMIN, 2003).

A identificação de *Cryptococcus* spp. pode ser feita através de um conjunto de características fisiológicas e bioquímicas. Para a distinção de outras leveduras clinicamente importantes, considera-se que todas as espécies de *Cryptococcus* não são fermentadoras de carboidratos, mas, por metabolismo oxidativo são assimiladoras de carboidratos (glicose, maltose, sacarose e galactose), assimilam o inositol, porém, não assimilam nitrato como única fonte de nitrogênio inorgânico e não sofrem redução a nitrito; hidrolisam o amido e produzem urease. Além dessas características, também são consideradas as características morfológicas da presença da cápsula e das raras presenças de pseudo-hifas. No entanto, *C. gattii* pode ser diferenciado do *C. neoformans* pela assimilação de glicina e resistência à canavanina, com a utilização do ágar CGB (MITCHELL e PERFECT, 1995; KWON-CHUNG e VARMA, 2006).

Segundo Kon et al. (2008), a criptococose é uma das micoses de mais fácil diagnóstico por apresentar marcado tropismo neurológico, presença de cápsula característica e abundância de elementos fúngicos no LCR.

Microbiológico

As principais técnicas de microscopia para a detecção de *Cryptococcus* diretamente do LCR, incluem a coloração com tinta da China (nanquim) e a coloração de Gram. Também podem ser incluídos outros procedimentos de coloração como o Giemsa, a coloração de Schiff e o corante fluorescente Calcofluor. Este último, no entanto, requer o uso de um microscópio fluorescente (COOVADIA et al., 2015).

Kon et al. (2008) mencionam que a levedura pode ser observada a partir de amostras de escarro, lavado brônquico, LCR, pus de abscesso, urina, aspirados de medula óssea e de gânglios ou fragmentos de tecidos. No entanto, na maioria dos casos de meningite criptocócica ou meningoencefalite, o fungo é isolado do SNC, a partir de amostras de LCR, centrifugada por 10 a 15 minutos. O diagnóstico é realizado por observação microscópica direta com coloração da tinta da China,

demonstrando em contraste negativo, as leveduras encapsuladas, cuja cápsula não permite a penetração do corante, possibilitando sua visualização e a sua diferenciação das demais células do material (PEDROSO e CANDIDO, 2006).

O uso da coloração da tinta da China continua a ser uma ferramenta diagnóstica comum para identificar *Cryptococcus* no LCR, porém a sensibilidade da microscopia é <86% (ABASSI, BOULWARE e RHEIN, 2015).

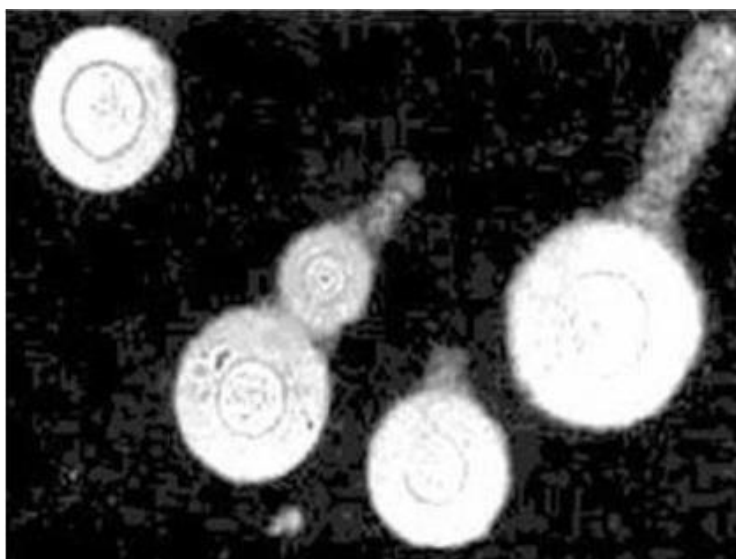


Figura 4: Halos de *C. neoformans*. Leveduras em brotamento rodeadas de halo capsulados transparente (cápsula polissacarídea). Coloração por tinta da China (Fonte: Leite et al., 2016).

Para o exame comprobatório da doença faz-se a cultura da levedura. O *Cryptococcus* cresce bem em vários meios de cultivos apropriados como ágar-sangue, ASD e ágar infusão de cérebro-coração, a temperaturas entre 25°C e 37°C, apresentando melhor crescimento a 30°C, cuja termotolerância máxima é de 40°C. A levedura é sensível a meios contendo ciclo-heximida. Após um período de incubação de 48h, podem ser observadas colônias mucóides de tonalidade creme. Também pode ser realizada a separação de *C. gattii* do *C. neoformans*, utilizando o meio CGB (KON et al., 2008).

Perfect e Bicanic (2015) mencionam que, em adultos com meningite criptocócica associada ao HIV, o exame do LCR e as hemoculturas são positivas em até 90% e 70% dos pacientes, respectivamente.

Bioquímico

Para o diagnóstico líquórico as pesquisas laboratoriais são de extrema importância para o diagnóstico nos casos de meningite. Através dessas metodologias é possível avaliar a intensidade do processo inflamatório, além da determinação dos agentes etiológicos e os parâmetros bioquímicos são amplamente solicitados. Tanto a glicose como as proteínas totais são indicativos importantes de alterações significativas do líquido, estando com valores alterados nos diferentes e complexos processos que envolvem sua modificação (LEITE et al., 2016).

O processo de investigação feito no LCR começa logo após a extração. São analisadas as características físicas do material, passando para os exames laboratoriais que verificam o aspecto e a cor, indo para as análises bioquímicas, microbiológicas, citológicas e investigação imunológica (PROESCHOLDT et al., 2000; SEEHUSEN et al., 2003).

No exame bioquímico do LCR a concentração normal de glicose no líquido corresponde a dois terços da sanguínea (42 a 78mg/dl em recém-nascidos e 50 a 80mg/dl em adultos); é comum ocorrer hipoglicorraquia em alguns casos de meningites como na fase aguda da meningite bacteriana, fúngicas e também nos processos crônicos e supurativos. Esta baixa concentração de glicose se dá pelo seu consumo pelos micro-organismos presentes (JERRARD et al., 2001). Já a dosagem de proteínas no LCR no estágio inicial da meningite se encontra elevada (> 40mg/dl), e a medida que o processo inflamatório se reduz, a concentração de proteína também se reduz. Entretanto, quando ocorre o aumento do processo inflamatório com aumento da quantidade de micro-organismos ou dano tecidual pode ser observado um aumento de sua concentração no líquido. Dependendo do local da punção, têm-se valores diferentes de referências para proteínas (MELO et al., 2003).

Zunt e Baldwin (2012) demonstraram que em meningites crônicas e subagudas causadas por micro-organismos (*Cryptococcus species*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Aspergillus fumigatus*, *Mycobacterium tuberculosis*) ocorreu aumento das concentrações de proteína e redução das concentrações de glicose.

Tratamento

A terapia atualmente empregada para o tratamento da criptococose consiste na administração combinada ou individual de polienos (anfotericina B – AmB e seus derivados lipossômicos), de azóis (cetoconazol, itraconazol, fluconazol e voriconazol) e de um análogo de pirimidina (5-flucitosina – 5-FC) (WILLIAMSON et al., 2016).

A AmB, sintetizada por *Streptomyces nodosus*, é o fármaco utilizado amplamente no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas. Ao interagir com o ergosterol da membrana celular do fungo, leva à formação de poros favorecendo a saída do conteúdo citoplasmático, como íons e metabólitos, principalmente íons potássio, provocando a morte do fungo, resultado da morte celular por danos oxidativos. No entanto, apresenta efeitos colaterais agudos e crônicos (MAZU et al., 2016); a 5-FC é metabolizada pelas células fúngicas em pirimidinas fluoradas (5-fluorouracil), que desestabiliza os ácidos nucleicos (ácido desoxirribonucleico – DNA e ácido ribonucleico – RNA), promovendo a inibição do crescimento celular. Já os azóis, como o fluconazol, inibem a enzima 14 α -desmetilase do citocromo P-450, diminuindo a síntese do ergosterol e levando a um acúmulo de lanosterol, composto tóxico para o metabolismo celular, alterando as propriedades e função da membrana celular fúngica (MAY, 2016; SANGIARD, 2016) (Figura 5).

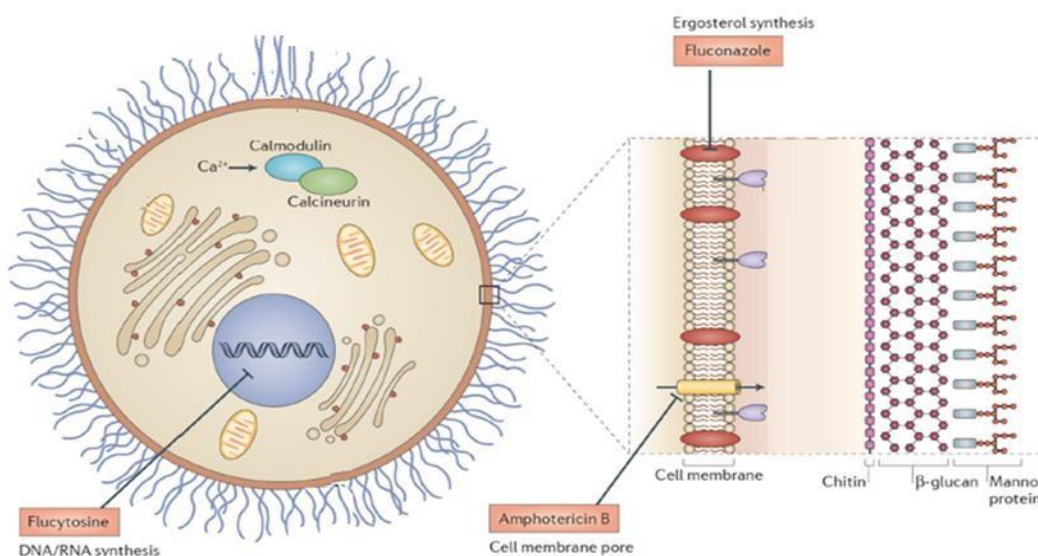


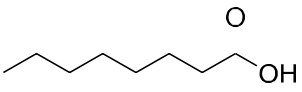
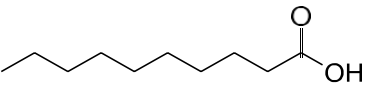
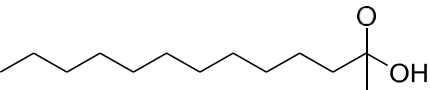
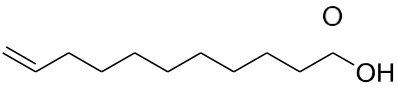
Figura 5: Representação esquemática de uma célula criptocócica, mostrando principais alvos terapêuticos atuais que atuam em cada sítio (Fonte: May et al, 2016 com modificações).

No entanto, esse tratamento é caracterizado por efeitos colaterais graves que levam à nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, além de ser pouco eficaz dado à resistência do micro-organismo ao uso generalizado desses medicamentos (LANIADO-LABORÍN e CABRALES-VARGAS, 2009; PERFECT e BICANIC, 2015; SANGULARD, 2016).

Atividade Antimicrobiana dos Ácidos Graxos

As propriedades antimicrobianas de muitos AGs já são bem conhecidas. Os AGs são formados por uma cadeia carbônica alifática com ácido carboxílico terminal (DESBOIS e SMITH, 2010; SHI et al., 2016). Podem ser saturados ou insaturados e o comprimento da cadeia varia de 4 a 28 carbonos. Pertencem a uma classe de molécula fisiologicamente importante envolvida no armazenamento de energia celular, estrutura da membrana e em várias vias de sinalização (POHL, KOCK e THIBANE, 2011; SHI et al., 2016). Os AGs caprílico ou ácido octanóico (C8:0), cáprico ou ácido decanóico (10:0) e láurico ou ácido dodecanóico (C12:0) são saturados de cadeia média, e o ácido undecilênico ou 10-undecenóico (C11:1) é monoinsaturado de cadeia média (Tabela 1).

Tabela 1: Estrutura dos ácidos graxos alifáticos testados

Estrutura	Nomenclatura	Fórmula Molecular	Peso Molecular (g/mol)
	Ácido caprílico	C ₈ H ₁₆ O ₂	144,21
	Ácido cáprico	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	172,26
	Ácido láurico	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	200,32
	Ácido undecilênico	C ₁₁ H ₂₀ O ₂	182,28

O ácido caprílico é um AG encontrado naturalmente no óleo de côco e no leite materno de mamíferos (incluindo humanos) (JENSEN, 2002), encontrado também como componente de algumas formulações para nutrição parenteral administrados por via intravenosa (RAYYAN et al., 2012). Nos estudos realizados por Rosenblatt et al. (2017), o ácido caprílico em uma combinação sinérgica com o ácido poligalacturônico demonstraram, em um modelo de erradicação de biofilmes *in vitro*, a eliminação completa do biofilme contra patógenos infecciosos hospitalares e alimentares de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos (*Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente, *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis*). Os autores também descobriram que a combinação de ambos ácidos não induz uma resposta citotóxica em fibroblastos de mamíferos.

Em uma revisão sobre atividades antifúngicas de AGs livres, Pohl, Kock e Thibane (2011) relataram a atividade antifúngica dos ácido caprílico, cáprico, láurico contra *Cucumerinum lagenarium*, *Fusarium oxysporum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Trichoderma viride*; do ácido cáprico contra *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus*, *Microsporum gypseum*, *Penicillium commune*, *Penicillium roqueforti*, *Pichia anomala*, *Rhodotorula mucilaginosa*, do ácido láurico contra *Aspergillus niger*, *Blumeria graminis*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium avenaceum*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* e dos ácidos caprílico e cáprico contra *Alternaria solani*, dos ácido cáprico e láurico contra *C. albicans*; dos ácidos caprílico, cáprico, láurico e undecilênico contra *Myrothecium verrucari*, *Saccharomyces cerevisiae*.

O ácido cáprico e caprílico conseguem inibir o crescimento de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus* produzidas durante a fermentação etanólica (VIEGAS et al., 1989). Já os ácidos cáprico, láurico e mirístico demonstraram possuir atividade contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Corynebacterium* sp., *Nocardia asteroides*, *Microcossus* sp. e *C. albicans* (KABARA et al., 1978). Souza et al. (2014) demonstraram a atividade antifúngica dos AGs alifáticos caprílico, cáprico e láurico contra *C. albicans*, como também investigaram a atividade antifúngica *in vitro*, a produção de exoenzimas e a citotoxicidade desses AGs. Elmore et al. (2014) relataram que a atividade antifúngica do óleo de coco obtido de *Cocos nucifera* L. contra *C. albicans* é devida à presença de AGs como ácido

caprílico, cáprico, láurico etc. Também observaram os efeitos antibacterianos destes ácidos contra certos organismos Gram-negativos (*Proteus vulgaris*, *P. mirabilis*, *P. rettgeri*, *E. coli*, *Serratia marcescens*, *P. aeruginosa* e *Salmonella typhimurium*), organismos Gram-positivos (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea*, *Micrococcus*, *Nocardia asteróides*, *Corynebacterium* e *pneumococcus*).

O ácido láurico é um AG encontrado em muitos vegetais, especialmente no óleo de côco e no óleo de semente de palma. No óleo de côco, é conhecido como um dos ingredientes mais ativos e compõe mais de 52% do total de 92% de gorduras saturadas presentes nesse óleo, possuindo propriedades antimicrobianas (DEBMANDAL E MANDAL, 2011). Nakatsuji et al. (2009) avaliaram a propriedade antimicrobiana do ácido láurico contra *Propionibacterium acnes* *in vitro* e *in vivo*. Nesse estudo, demonstraram que a *P. acnes* é uma bactéria sensível ao ácido láurico. Além disso, esse ácido não induziu citotoxicidade aos sebócitos humanos. E nesse estudo *in vivo*, com aplicações de injeções intradérmica e epicutânea de ácido láurico, diminuiu, efetivamente, o número de *P. acnes* colonizadas em orelhas de camundongos, aliviando tanto o inchaço da orelha induzido pela *P. acnes* quanto à inflamação granulomatosa. Lee e Jo (2016), ao compararem a atividade antimicrobiana de um ácido láurico sintético (laurato de sódio) com a clorexidina ou hidróxido de cálcio contra o biofilme de *Streptococcus Mutans*, observaram que o AG laurato de sódio sintético apresentou atividade antimicrobiana significativamente maior que o hidróxido de cálcio, inibindo a sobrevivência microbiana e o crescimento de biofilme contra *S. mutans*, embora não tenha apresentado diferença significativa em relação à clorexidina. Anzaku et al. (2017) realizaram um estudo *in vitro* para examinar a intensidade do ácido láurico na inibição de alguns isolados clínicos de pacientes com infecção do trato urinário, infecção do trato respiratório e infecção do trato digestivo. Nesse estudo, o ácido láurico mostrou efeito inibitório considerável em *S. aureus*, em *Streptococcus pneumonia* e *Mycobacterium tuberculosis*.

O ácido undecilênico é um AG monoinsaturado encontrado naturalmente no organismo (glândulas sudoríparas) e produzido comercialmente pela destilação à vácuo do óleo de mamona, através da pirólise do ácido ricinolêico (VAN DER STEEN e STEVENS, 2009; MOHAMMAD, FARUQ e MUSTAFA, 2010). Este ácido e seus sais, como o undecilenato de zinco, possuem propriedades antimicrobianas e

são ingredientes ativos em muitas preparações antifúngicas tópicas (NIKOLOV e GANCHEV, 2010). As propriedades fúngicas e a eficácia do ácido undecilênico são conhecidas há bastante tempo. Neuhauser (1994) observou que o ácido undecilênico tem se mostrado aproximadamente seis vezes mais efetivo como antifúngico do que o ácido caprílico em pesquisas frente a *C. albicans* relacionado à flora intestinal e vaginal. Shapiro e Rothman (1945) relataram sua eficiência ao tratamento de dermatomicoses causadas por *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton inguinale* e *Microsporum audouini*, enquanto que Rheder e Guyen (2008) relataram a sua eficiência no tratamento de onicomicose causada por *Trichophyton rubrum*. Além disso, o ácido undecilênico possui a capacidade de inibir a formação de hifas em *C. albicans*, cujo mecanismo envolvido pode ser definido como a inibição de enzimas envolvidas na síntese lipídica (MCLAIN et al., 2000).

3.4.1 Mecanismo de Ação dos Ácidos Graxos

Os estudos que envolvem a atividade antifúngica de AGs sugerem que a membrana celular do fungo é um dos alvos de drogas, o que pode vir a afetar enzimas ou metabólitos que estão associados à homeostase lipídica. Em uma célula viável, o conteúdo e o tipo de AG nas membranas de células de levedura atuam para manter uma fluidez necessária para a realização de suas funções biológicas. A perturbação da homeostase da membrana celular interrompe o crescimento celular, podendo levar à morte celular quando há uma falha ao mecanismo de resposta ao estresse (SHI et al, 2016).

McLain et al. (2000) explicam o mecanismo de ação o efeito antifúngico dos AGs em um estudo utilizando ácido undecilênico em *C. albicans*. Nesse estudo, demonstram que o ácido inibe a conversão de levedura em hifas (que estão associadas à infecção ativa) via inibição da biossíntese de AGs. Em geral, o mecanismo de ação e eficácia dos antifúngicos de AGs depende do número de átomos de carbono na cadeia, com a eficácia aumentando ao longo do número de átomos na cadeia. Além disso, também foi demonstrado que os AG de cadeia média conseguem alterar o pH do citoplasma da célula, sendo portadores de prótons (STEVEN e HOFEMYER, 1993).

Atividade Antioxidante dos Ácidos Graxos

Os antioxidantes são bem conhecidos por desempenharem papel importante na proteção contra danos oxidativos. Estudos mostraram que alimentos ricos em antioxidantes contribuem na prevenção de certas doenças as cardiovasculares e o câncer (FREI, 2004).

Vários estudos já demonstraram a capacidade antioxidante de alguns AGs. Kidwai et al. (2011) sintetizaram derivados acílicos de cumarinas usando diferentes ácidos, dentre os quais, ácido caprílico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico etc. e relataram o potencial antioxidante destes compostos utilizando os métodos DPPH e o ABTS. Henry et al. (2002) avaliaram a atividade antioxidante de AGs saturados e insaturados usando espectroscopia de fluorescência e observaram que a atividade antioxidante dos AGs saturados aumenta com o aumento do comprimento da cadeia carbônica, desde o ácido octanóico até o ácido mirístico, enquanto que AGs insaturados apresentaram boa atividade antioxidante, com exceção do ácido undecilênico, ácido cis-5-dodecenóico e ácido nervônico. De Assis et al. (2003) investigaram os efeitos *in vitro* do ácido octanóico, que se acumula na deficiência de acil-CoA desidrogenase de cadeia média (MCAD). Esses autores observaram que o ácido decanóico, que também é aumentado na deficiência de MCAD, e o ácido oléico reduziram fortemente a atividade de Na⁺, K⁺-ATPase, enquanto o ácido palmítico não teve efeito. Estudos *in vivo* em ratos também mostraram que o efeito antioxidante dos AGs em modelos cerebrais pode induzir o estresse oxidativo. Um estudo realizado por Sengupta et al. (2014) avaliou a eficácia antioxidante de óleos de farelo de arroz rico em AGs de cadeia média (ácido caprílico, cáprico e láurico) em comparação com óleo de farelo de arroz considerando parâmetros bioquímicos alterados de estresse oxidativo após tratamento com arsenito de sódio em ratos.

Fluído Espinhal Simulado

Os primeiros relatos de uso de fluidos cerebrospinais artificiais (ACSFs) foram em 1949, denominados soluções de Elliot A e B (SHIOBARA et al, 2013). Lofsness & Jensen (1983) propuseram um modelo de FES como uma forma de treinamento de estudantes para a análise do LCR, considerando os diversos dos problemas que ocorrem na análise do LCR como resultado de um treinamento inadequado do

peçoal que realiza os testes. Segundo os autores, o método para preparar esta solução é simples, barato e requer apenas equipamentos que estejam prontamente disponíveis no laboratório de ensino. Além de oferecer técnicas de contagem e identificação de células, também possibilita análises de glicose e proteínas totais. Shiobara et al (2018), por sua vez, obtiveram a aprovação de comercialização para o ACSF (Fluído Cerebral Artificial) comercialmente disponível (ARTCEREB) do Ministério da Saúde do Japão. O ARTCEREB foi destinado a experimentos básicos, estudos sobre seu uso como fluido de irrigação para neurocirurgia e em fase II e III ensaios clínicos.

4 Manuscrito

A metodologia e os resultados obtidos nesta dissertação serão apresentados em forma de manuscrito e representam a íntegra deste estudo. O presente manuscrito está formatado segundo as normas da revista a qual foi submetido: *Microbial Pathogenesis* (ISSN: 0882-4010).

Simulated Spinal Fluid as a model for the study of the antifungal activity of aliphatic fatty acids against *Cryptococcus* species

Edila Maria Kickhofel Ferrer^a, Christian Masseron Nunes^a, Milena Mattes Cerveira^a, Cláudio Martin Pereira de Pereira^b, Bruno Nunes da Rosa^b, Aleksandro Schafer da Silva^c, Rodrigo de Almeida Vaucher^{a*}

^a Laboratory of Biochemistry Research and Molecular Biology of Microorganisms (LaPeBBioM), Universidade Federal de Pelotas, RS, Brazil.

^bCenter of Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brazil.

^c Graduate Program in Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina, Chapecó, Santa Catarina, Brazil.

***Corresponding author.**

Graduate Program in Biochemistry and Bioprospecting, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

Email addresses: rodvaucher@hotmail.com (R A Vaucher)

ABSTRACT

The research of new methods to evaluate the growth capacity of *Cryptococcus* fungi species is of fundamental importance for the evaluation of new bioactive compounds, e.g; including; such as aliphatic fatty acids. A model that has already been proposed to mimic the conditions of the CSF was the simulated spinal fluid (SSF) that emerges as an interesting alternative. The objective of this study was to evaluate the antifungal activity of aliphatic fatty acid against *Cryptococcus* species using the simulated spinal fluid model (SSF). The antioxidant activity of aliphatic fatty acid was evaluated using FRAP assay. MIC and MFC of each acid were determined environmental isolates and strains of *C. neoformans*, *C. grubii* and *C. gattii*. Antifungal activity was also evaluated *in vitro* in SSF inoculated with fungi. Acids activities were monitored by fungal growth curve and determination of glucose and protein levels. Fatty acids display a better antioxidant activity than vitamin C. MIC and MFC values evaluated in the different fungi were: capric acid 0.19 - 0.80 and 0.75 - 3.04, lauric acid 0.09 - 0.80 and 0.19 - 0.80, caprylic acid 1.50 - 6.04 and 0.19 - 0.80 and undecylenic acid 0.38 - 2.94 and 0.38 - 5.89 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, for each fatty acid, respectively. The growth of *Cryptococcus* species in SSF was satisfactory being observed significantly increased the log CFU mL^{-1} number in the 72-hour culture period. Only lauric acid was able to inhibit the growth of the three different species of *Cryptococcus* at the tested concentrations. Levels of glucose for *C. neoformans* significantly reduced in lauric acid treatment. At 2x MIC glucose levels were significantly reduced for *C. grubii*, in lauric acid treatment at 2x MIC in 24-hour and capric acid at 48-hour at this concentration. For *C. gattii* glucose levels were significantly reduced a period of 48 hours in lauric acid treatment, capric acid at $\frac{1}{2}$ MIC, MIC and 2x MIC and undecylenic acid at the concentration of 2x MIC at all time of 48 hours, but it did not show significant reduction of protein levels at the times tested. The results observed with the application of the SSF model inoculated with *Cryptococcus* species were able to demonstrate the *in vitro* antifungal activity of aliphatic fatty acids. Therefore, the SSF model can be considered an interesting alternative for the study of CSF-like bioactive compounds.

Keywords: Aliphatic fatty acids; *Cryptococcus* species; simulated spinal fluid, antifungal activity.

1. Introduction

Infectious diseases represent a critical health problem and continue to be a major cause of morbidity and mortality worldwide. Most deaths affecting immunocompromised patients are attributed mainly to opportunistic fungi of the genus *Candida*, *Aspergillus* and *Cryptococcus* [1].

In recent years there has been an increase in the incidence of fatal opportunistic fungal infections, such as cryptococcosis, due to the growth of the associated immunocompromised population, mainly patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS/HIV), who use chemotherapy or have undergone organ transplantation [2].

Cryptococcosis is a systemic and opportunistic mycosis caused by capped yeast *C. neoformans*, worldwide recognized as the main responsible for cryptococcal meningitis [3]. This infection is acquired by the inhalation of propagules in the form of spores dispersed in the environment, affecting the lungs, resulting in primary infection and it reaches the central nervous system (CNS) through the bloodstream and causing meningoencephalitis [1, 4, 5]. The therapy used for the treatment of cryptococcosis consists of a combined or individual administration of polyenes (amphotericin B and its liposomal derivatives), azoles (ketoconazole, itraconazole, fluconazole and voriconazole) and a pyrimidine analogue (5-flucytosine-5-FC) [6]. However, these therapeutic options are of great toxicity and may show fungi resistance [2, 6, 7].

Hence the search for new therapeutic agents for the treatment of cryptococcal meningitis has been the target of some studies. An interesting alternative that has been investigated as an antifungal agent are fatty acids. It is believed that fatty acids may present a number of advantages over conventional antifungal agents as they may present lower cytotoxicity, lower risk of environmental contamination, higher biodegradability and biocompatibility [8 - 10].

Souza et al. [11] investigated the *in vitro* antifungal activity, exoenzyme production and cytotoxicity of some aliphatic fatty acids and their ester derivatives against *Candida* species. In this study the authors investigated the antifungal activity of fatty acids (capric, caprylic, lauric and myristic acid) and observed that lauric acid showed activity against *Candida* species. The authors observed a significant inhibition in the production of phospholipase, after the addition of fatty acids. In addition, fatty acid tests revealed a cell viability of 80% demonstrating a potential

applicability of these molecules as antifungal. In addition, few studies have been proposed to evaluate the antifungal activity of fatty acids against fungi of the genus *Cryptococcus* [12, 13, 14, 15].

The use of an *in vitro* model that corresponds to growth conditions for the fungus *Cryptococcus* spp. in the cerebrospinal fluid is considered of fundamental importance for the antifungal evaluation of new bioactive compounds. A proposed model was the simulated spinal fluid model (SSF) that emerges as an interesting alternative and can be used for this purpose. In this model it is possible to mimic the physicochemical characteristics of CSF. The model can provide the necessary conditions for fungal growth and evaluation of the biochemical characteristics present in the fluid after inhibition or fungal growth [16]. However, there is no literature on the use of this model to evaluate the antifungal activity of fatty acids.

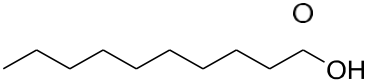
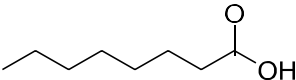
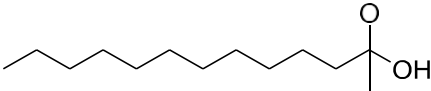
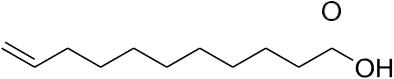
In this context, the objective of this study was to evaluate the antifungal activity of aliphatic fatty acid against *Cryptococcus* spp. using the simulated spinal fluid model (SSFM) for this purpose.

2. Materials and methods

Antifungal agents

For the evaluation of the antifungal activity medium-chain fatty acids (capric, caprylic, lauric and undecylenic acid) were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). The stock solution of each acid was prepared in DMSO at the final concentration of 30 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ for capric and lauric acid, 486 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ for caprylic acid and 480 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ for undecylenic acid. The general structure of each compound is shown in **Table 1**. Amphotericin B at the concentration of 50 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ was used as control.

Table 1: Structure of tested aliphatic fatty acids

Structure	Nomenclature	Molecular Formula	Molecular Weight (g/mol)
	Capric acid	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	172.26
	Caprylic acid	C ₈ H ₁₆ O ₂	144.21
	Lauric acid	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	200.32
	Undecylenic acid	C ₁₁ H ₂₀ O ₂	182.28

Isolates and culture conditions

Three strains of *Cryptococcus* obtained from the American Type Culture Collection (*C. neoformans* ATCC 28957, *C. grubii* ATCC 208821, *C. gattii* ATCC 56990) and five environmental isolates of *Cryptococcus* spp. (A13C, A21C, A13B, A6 and AP9) were used in the study. The environmental samples were isolated from pigeon feces collected in the central square of the city of Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. The identification in the Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology of Microorganisms (LaPeBBioM/UFPel) after cultivated aerobically on SDA (Sabouraud dextrose agar) with chloramphenicol and incubated at 35 ± 2 °C for 72 h. Direct examination of the colonies was performed using a blade containing a heave of the colony, an India ink drop and overlapping the cover slip, and observed by microscopy in a 40x objective. The identification of the isolates was obtained by using physiological methods and biochemical tests. The suggestive colonies of *Cryptococcus* spp. were collected in Agar urea and Agar Niger to evaluate the action of urease and phenoloxidase, respectively and incubated at 30 ± 2 °C for 48 h as described by Cunha et al. [17].

FRAP assay

For the determination of the antioxidant capacity of fatty acids the FRAP assay was employed, following the methodology described by Benzie and Strain [18], adapted to the Cobas Mira® automated system (Roche Diagnostics, Switzerland). The FRAP assay reagent was prepared from a combination of acetate buffer solution with TPTZ (2,4,6-tris (2-pyridyl)-s-triazine), and aqueous ferric chloride solution. At acid pH, the complex Fe^{3+} is reduced to Fe^{2+} and forms an intense blue solution. As a reference, FRAP reagent solution was used and the absorbance was measured at 600 nm. For the calibration curve, FeCl_2 was used as a standard in concentrations ranging from 50 to 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. The results were expressed in $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Minimal inhibitory concentration (MIC) and Minimal Fungicidal Concentration (MFC)

The minimal inhibitory concentration (MIC) was carried out following CLSI M27-A3 method [19]. After a 48 h incubation period of *Cryptococcus* strains on fresh SDA, yeasts were harvested and saline solution at a turbidity equal to an optical density of 0.5 McFarland units. The final suspension was adjusted to 1.5×10^8 CFU mL^{-1} . The solution containing each fungal inoculum was transferred in aliquots of 100 μL into each well of a sterile 96-well plate previously loaded with 10 μL of the solution containing the dilution of the compound tested. The plates were incubated at 35 ± 2 °C for 48-hour. The minimum inhibitory concentration (MIC) and a previous dilution ($\frac{1}{2}$ MIC) that were seeded with the aid of a bacteriological needle on SDA-containing plates were considered for the minimum fungicidal concentrations (MFC). The MFCs were defined as the lowest fatty acid dilutions that did not yield growth of yeast colonies (100% killing activity) after 48h of aerobic incubation at 35 ± 2 °C. The readings were made visually.

Preparation of Simulated Spinal Fluid (SSF)

Simulated Spinal Fluid (SSF) was prepared following the methodology proposed by Lofsness & Jensen [16] with modifications. For the preparation, saline solution equilibrated with Hanks medium (102) without phenol red (Sigma-Aldrich, Brazil) and diluted 1:10 with sterile distilled water was used. Subsequently, 30% (v/v) bovine albumin was added to the fluid. They were not added to the same red cell or

leukocytes, according to the original methodology proposed by the authors. The fluid was filtered and stored in the refrigerator until use.

Growth of Cryptococcus in SSF

The fungi *C. neoformans* ATCC 28957, *C. grubii* ATCC 208821 and *C. gattii* ATCC 56990 were initially cultured in SDA at 35 ± 2 °C for 48 h. After growth, fungal suspensions containing pure colonies of each fungus were generated and adjusted to the 0.5 McFarland turbidity scale. Subsequently, 10 µL of each fungi inoculum were added to 10 mL of SSF. The latter solution was homogenized obtaining a final concentration of 1.5×10^6 CFU mL⁻¹ of each fungi. 1 mL aliquot of the homogenized solution was added into microtubes. Fungal growth in SSF was monitored during a period of 72 hours, with intervals of 24 hours each. At these times quantitative seeding was performed using 10 µL disposable calibrated handles on plates containing SDA and then the plates were incubated at 35 ± 2 °C for 72-hour. Subsequently, the colonies were counted and the values expressed mean $\pm$ SD of CFU mL⁻¹ for each fungus. All experiments were performed in duplicate.

Antifungal activity and biochemical determination in SSF

Antifungal activity was evaluated in the growth conditions of the different *Cryptococcus* species as described in item 2.6. Three different concentrations of capric acid (0.40, 0.80 and 1.6), lauric acid (0.40, 0.80 and 1.6), caprylic acid (1.50, 3.01 and 6.02) and undecylenic acid (0.75, 1.5 and 3.0 µg µL⁻¹) equivalent to ($\frac{1}{2}$ MIC, 1x and 2x MIC) were used. After a quantitative plate count method was used to determine CFU mL⁻¹. 10 µL of SSF containing the above-mentioned concentrations of each fatty acid were seeded directly into SDA and incubated at 35 ± 2 °C for 24 h. From the supernatant the glucose and protein levels present in the SSF were determined after treatment with fatty acids and presence of each fungi. All evaluations were performed in duplicate from the culture supernatant containing SSF using the kit from Labtest (Lagoa Santa/MG, Brazil) in the Cobas Mira® automated system (Roche Diagnostics, Switzerland).

Statistical analysis

Data were expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD) for three independent determinations for each experimental point. Data were analyzed with software package GraphPad Prism 4.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego-CA, USA). All data of this study were submitted to analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Dunnett test ($p < 0.05$).

3. Results

Antioxidant activity

Fig. 1 this represents the antioxidant activity of fatty acids using the FRAP assay. The results showed that all the fatty acids tested showed antioxidant activity, however, when compared to the positive control (Vitamin C), this activity was not significant. Caprylic acid was the one with the highest antioxidant activity among the tested, followed by lauric acid, undecylenic acid and capric acid.

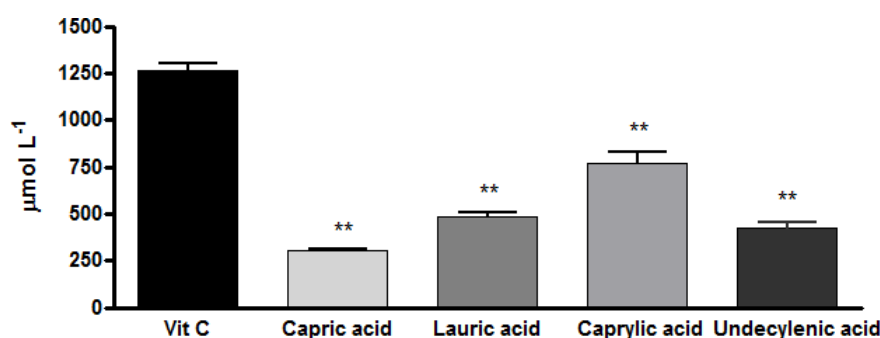


Fig. 1. Antioxidant activity of aliphatic fatty acid were measured by ferric reducing/antioxidant power and expressed as FRAP ($\mu\text{mol L}^{-1}$). Values are mean $\pm$ S.D. indicate statistical differences compared to one-way ANOVA followed by Dunnett test at $p < 0.01$ (**) when groups were compared to Vitamin C (Vit C).

Minimal inhibitory concentration (MIC) and Minimal Fungicidal Concentration (MFC)

Table 2 shows the results of MIC and MFC of fatty acids against different strains of *Cryptococcus* spp. The MICs of the fatty acids ranged from 0.19 to 0.80 for capric acid, 0.09 to 1.5 for lauric acid, 1.5 to 6.03 for caprylic acid and 0.38 to 2.94 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ for undecylenic acid. From the results obtained from of the MFC, it was evident that the fatty acids at most concentrations tested against *Cryptococcus* strains had fungicidal activity.

Table 2: Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of the aliphatic fatty acid against *Cryptococcus* spp. estimated by the microdilution method.

Microorganism	Capric acid $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$		Lauric acid $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$		Caprylic acid $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$		Undecylenic acid $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>C. neoformans</i> ATCC 28957	0.75	0.75	1.5	1.5	5.83	5.83	2.94	5.89
<i>C. grubii</i> ATCC 208821	0.75	0.75	0.75	0.38	5.83	5.83	0.70	0.70
<i>C. gattii</i> ATCC 56990	0.38	0.75	0.75	0.38	0.09	0.18	0.04	0.09
A13C (<i>Cryptococcus</i> spp.)	0.38	3.04	0.80	0.80	3.04	0.38	1.50	1.50
A21C (<i>Cryptococcus</i> spp.)	0.19	0.75	0.09	0.19	1.50	0.19	0.38	0.38
A13B (<i>Cryptococcus</i> spp.)	0.80	1.71	0.80	0.80	3.43	0.80	0.42	0.84
A6 (<i>Cryptococcus</i> spp.)	0.80	3.01	0.80	0.80	6.03	0.80	2.94	5.89
AP9 (<i>Cryptococcus</i> spp.)	0.80	3.01	0.80	0.80	6.03	0.80	1.47	1.47

* The results were expressed as mean $\pm$ SEM; n = 2.

Growth of *Cryptococcus* species in SSF

The growth of the *Cryptococcus* species in the SSF was evaluated through a growth curve within 72 hours. It can be seen in **Fig. 2** that the fungi significantly increased the log number CFU mL^{-1} in the 72-hour culture period. Both *C. neoformans* and *C. gattii* showed a significant increase of approximately 2.4 and 2.3 log from time 0 to 72-hour of culture, respectively. *C. grubii* obtained a significant increase of 2.5 log of time 0 to 48-hour.

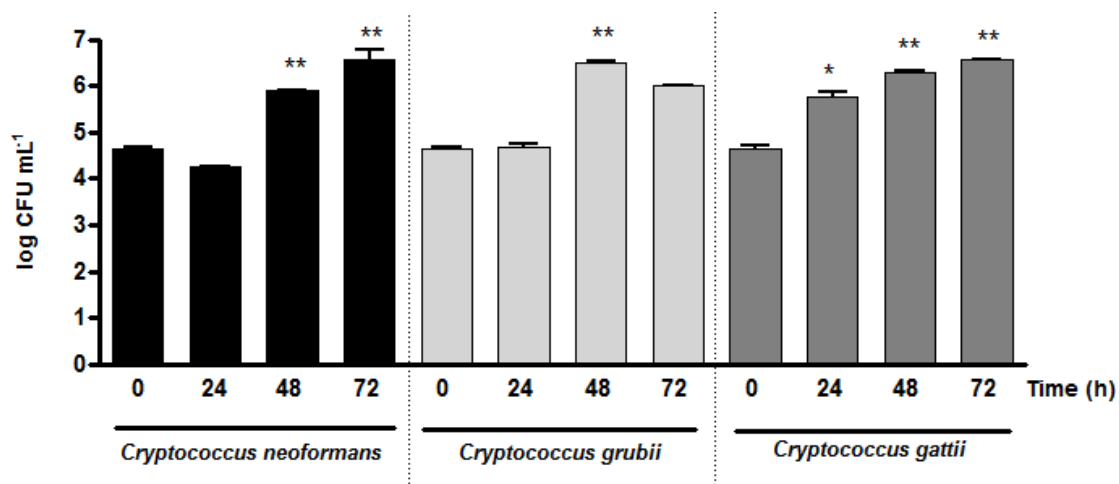


Fig. 2. Growth of the *Cryptococcus* species in the SSF. Values represent the mean $\pm$ S.D (log CFU mL^{-1}) and indicate statistical differences compared to one-way ANOVA followed by Dunnett test at $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**) when groups were compared to fungal control at time 0.

Antifungal activity of aliphatic fatty acid in SSF

The results of the antifungal activity of the $\frac{1}{2}$ MIC, MIC and 2x MIC concentrations of each fatty acid in the SSF against the *Cryptococcus* species can be visualized in **table 3**.

Table 3: Antifungal activity of the different concentrations ($\frac{1}{2}$ MIC, MIC and 2x MIC) of the fatty acids against the species of *Cryptococcus*.

Aliphatic fatty acid	Concentration	<i>C. neoformans</i>				<i>C. grubii</i>				<i>C. gattii</i>			
		0	24h	48h	72h	0	24h	48h	72h	0	24h	48h	72h
Capric acid	$\frac{1}{2}$ MIC	4.65	NG	NG	5.87	4.65	NG	NG	NG	4.65	NG	NG	NG
	MIC	4.65	NG	NG	NG	4.65	NG	NG	NG	4.65	NG	NG	NG
	2x MIC	4.65	NG	NG	NG	4.65	NG	NG	NG	4.65	NG	NG	NG
Lauric acid	$\frac{1}{2}$ MIC	4.65	NG	NG	NG	4.65	NG	NG	NG	4.65	NG	NG	NG
	MIC	4.65	NG	NG	NG	4.65	NG	NG	NG	4.65	NG	NG	NG
	2x MIC	4.65	NG	NG	NG	4.65	NG	NG	NG	4.65	NG	NG	NG
Caprylic acid	$\frac{1}{2}$ MIC	4.65	NG	NG	5.25	4.65	NG	NG	NG	4.65	NG	NG	NG
	MIC	4.65	NG	NG	4.27	4.65	NG	NG	NG	4.65	NG	NG	NG
	2x MIC	4.65	NG	NG	NG	4.65	NG	NG	5.65	4.65	NG	NG	NG
Undecylenic acid	$\frac{1}{2}$ MIC	4.65	NG	NG	5.65	4.65	NG	NG	NG	4.65	NG	NG	NG
	MIC	4.65	NG	NG	6.00	4.65	NG	NG	NG	4.65	NG	NG	NG
	2x MIC	4.65	NG	NG	NG	4.65	NG	NG	NG	4.65	NG	NG	NG
Fungal control	-	4.65	5.00	5.52	6.58	4.65	5.78	6.32	6.58	4.65	5.78	6.29	6.55
Amphotericin	50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	4.65	NG	NG	NG	4.65	NG	NG	NG	4.65	NG	NG	NG

Mean values of fungal counts= log CFU mL⁻¹; NG = No growth; Time = hour.

All the tested concentrations of fatty acids with values of $\frac{1}{2}$ MIC, MIC, and 2x MIC for the 24 and 48-hour times, were able to inhibit the growth of the tested fungi compared to the control (AmpB). However, for *C. neoformans* the growth was observed in 72-hour period when tested the concentration of $\frac{1}{2}$ MIC for treatment with capric acid, $\frac{1}{2}$ MIC and MIC for caprylic and undecylenic acid, respectively. Regarding the tested fatty acids it can be observed that only lauric acid was able to inhibit the growth of the three different species of *Cryptococcus* at the concentrations tested.

Biochemical determination in SSF

Concerning the antifungal activity of the $\frac{1}{2}$ MIC, MIC and 2x MIC concentrations of each fatty acid in the SSF against the *Cryptococcus* species were evaluated in the supernatant by determining the glucose and protein levels (**Fig. 3, 4 and 5**).

For *C. neoformans* (**Fig. 3**), glucose levels were significantly reduced in lauric acid treatment at concentrations of 2x MIC and $\frac{1}{2}$ MIC at 24 and 48-hour times, respectively. For capric acid a significant reduction in glucose levels was observed at $\frac{1}{2}$ MIC in the time of 72 hours. All other acids at the times evaluated did not

significantly alter glucose levels indicating the efficiency of the acids in inhibiting the growth of this fungus at these concentrations.

Protein levels were significantly reduced in treatments with capric acid and undecylenic acid at concentrations of 2x MIC at times of 24 and 48 hours. For caprylic acid there was a significant reduction in protein levels at ½ MIC, MIC and 2x MIC at 24 hours, MIC and 2x MIC at 48 hours and 2x MIC at 72 hours. However, lauric acid did not show significant reduction of protein levels at the times tested indicating its potential to inhibit the growth of this fungus at these concentrations.

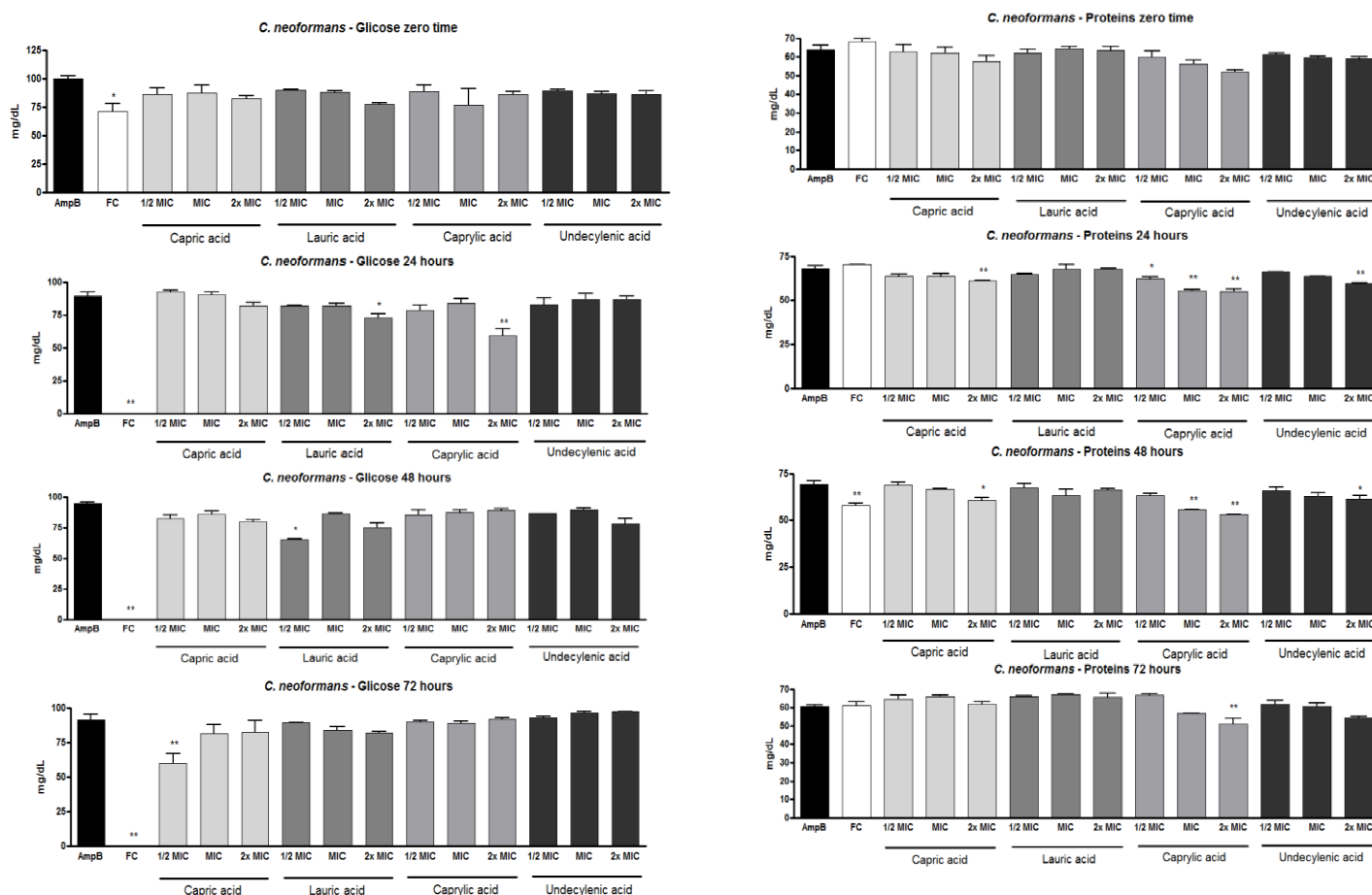


Fig. 3. Glucose and protein levels in the SSF determined during the growth of fungal *C. neoformans* in the different concentrations of fatty acids and times tested. Values represent the mean $\pm$ SD (mg dL⁻¹) and indicate statistical differences compared to one-way ANOVA followed by Dunnett test at $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**) when groups were compared to fungal control at Amphotericin B (AmpB). Fungal control (FC).

For *C. grubii* (**Fig. 4**), glucose levels were significantly reduced in lauric acid treatment at 2x MIC in 24 hours and capric acid at 48 hours at this concentration.

The other acids at the times evaluated did not significantly alter glucose levels, indicating the efficiency of these acids in inhibiting the growth of this fungus at these concentrations. No significant modifications were observed in the protein levels for capric and lauric acid at the times tested. However, for caprylic acid caprylic a significant reduction was observed for MIC and 2x MIC in the time of 48-hour, and at the concentrations of MIC and 2x MIC in 72 hours. For undecylenic acid only the concentration of 2x MIC at 72 hours time can show this significant reduction of proteins.

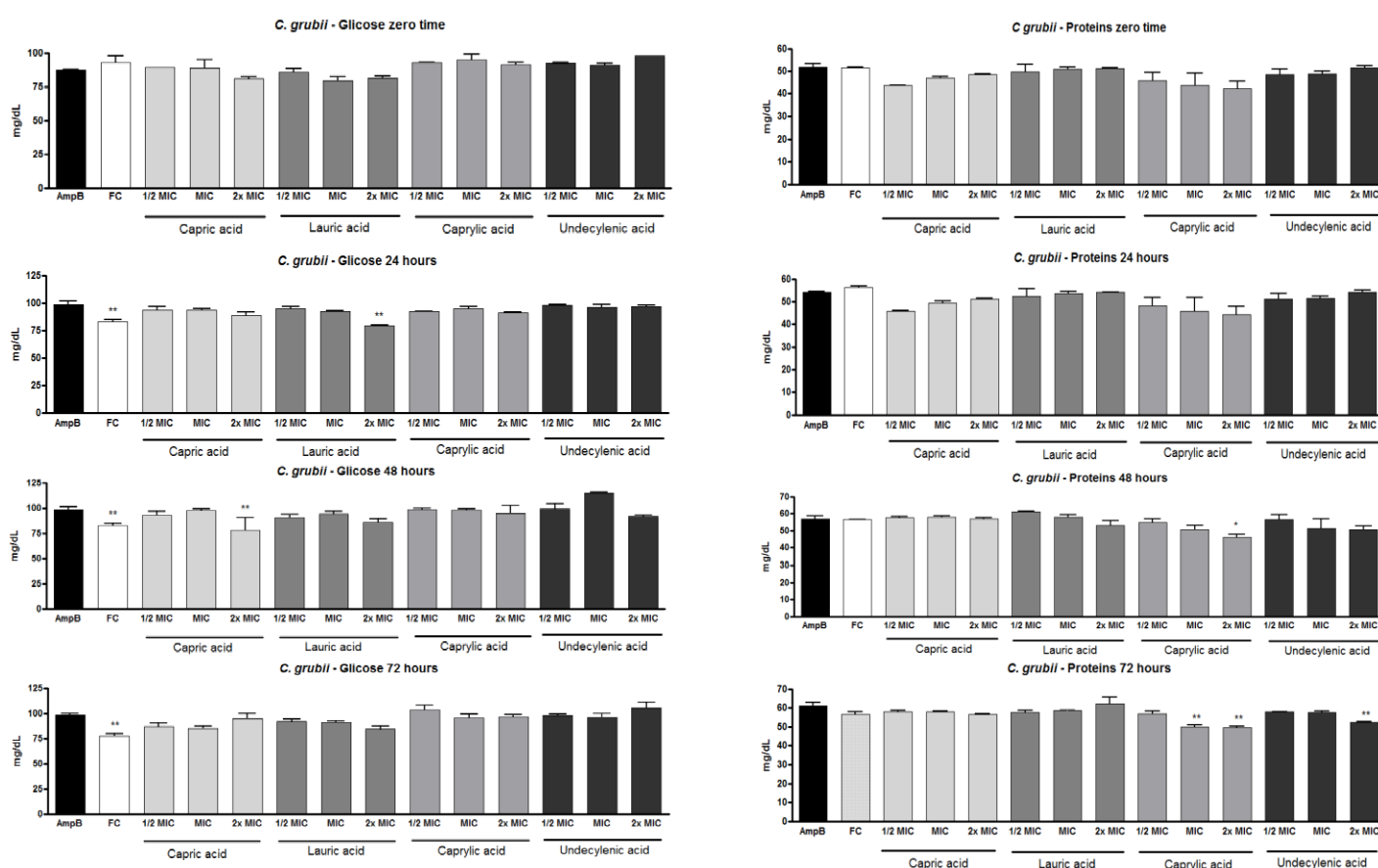


Fig. 4. Glucose and protein levels in SSF determined during growth of fungal *C. grubii* at different concentrations of fatty acids and times tested. Values represent the mean $\pm$ SD (mg dL⁻¹) and indicate statistical differences compared to one-way ANOVA followed by Dunnett test at $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**) when groups were compared to fungal control at Amphotericin B (AmpB). Fungal control (FC).

For *C. gattii* (**Fig. 5**) glucose levels were significantly reduced in lauric acid treatment at concentrations of MIC and 2x MIC, capric acid at $\frac{1}{2}$ MIC, MIC and 2x MIC and undecylenic acid at the concentration of 2x MIC all concentration at time of 48 hours. The other acids at the times evaluated did not significantly alter glucose

levels. At protein levels no significant changes were observed for capric, lauric and undecylenic acid at the times tested. However, for caprylic acid a significant reduction was observed for MIC concentration and 2x MIC at 24 hour times.

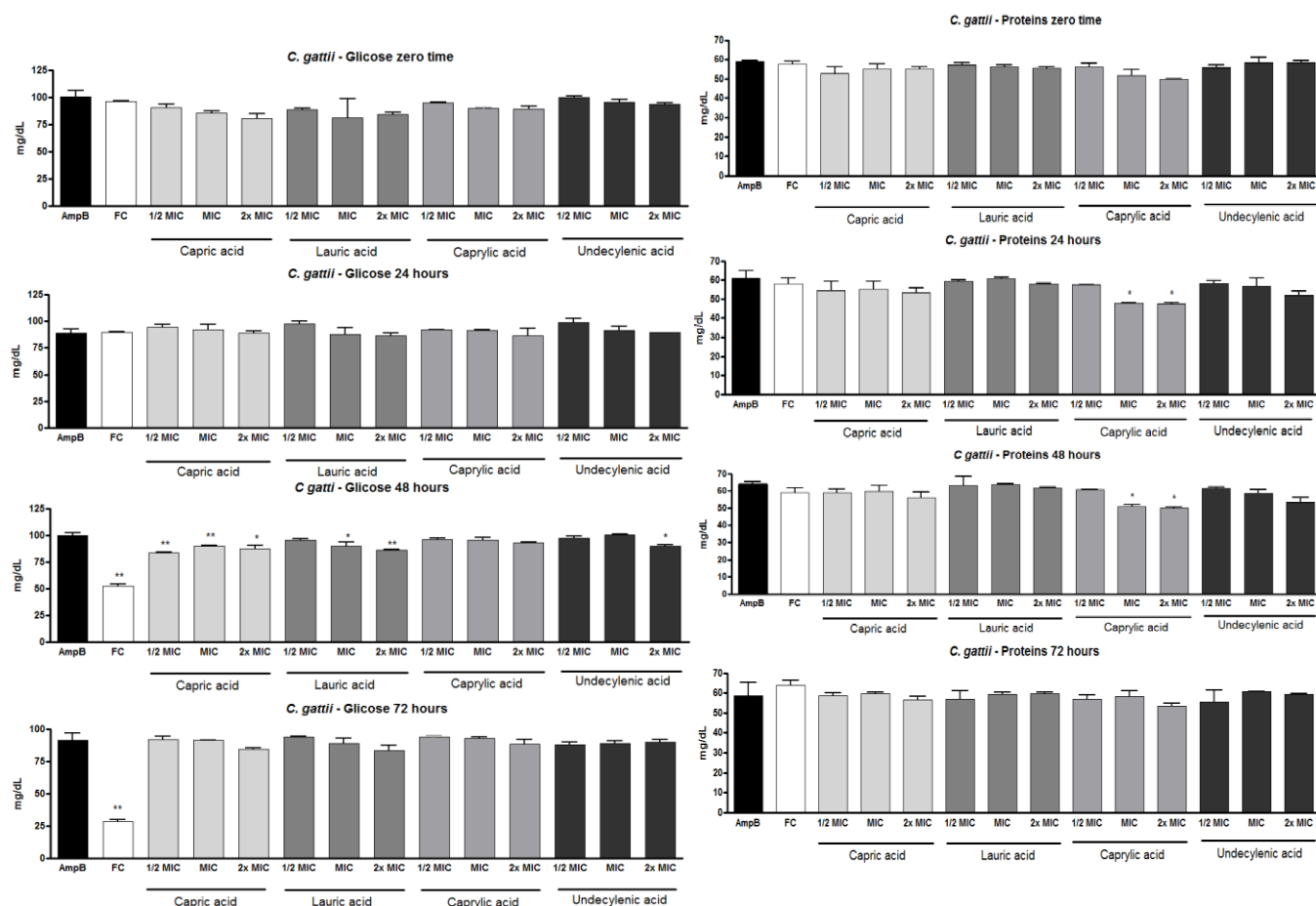


Fig. 5. Glucose and protein levels in SSF determined during *C. gatti* fungal growth at different concentrations of fatty acids and times tested. Values represent the mean $\pm$ SD (mg dL⁻¹) and indicate statistical differences compared to one-way ANOVA followed by Dunnett test at $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**) when groups were compared to fungal control at Amphotericin B (AmpB). Fungal control (FC).

4. Discussion

The antioxidant activity of fatty acids using the FRAP assay initially was evaluated in this study. FRAP assay [18] is based on the ability of phenols in reducing Fe^{3+} to Fe^{2+} , which is accompanied by the formation of a colored complex

with Fe^{2+} . This complex has an intense blue staining, susceptible to be quantified spectrophotometrically at 600 nm, which is proportional to the amount of reducing species present in the sample [20].

Our results indicate that caprylic acid was the one with the best antioxidant activity, followed by lauric acid, undecylenic acid and capric acid (**Fig. 1**). Henry et al. [21] found that saturated fatty acids at the concentration of $60 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ increase in antioxidant activity with increasingly chain length from octanoic acid to myristic acid. Unsaturated fatty acids at the same concentration showed good antioxidant activity except for undecylenic acid, cis-5-dodecenoic acid, and nervonic acid. De Assis et al. [22] investigated the *in vitro* effects of octanoic acid, which accumulates in medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency. They observed that decanoic acid, which is also increased in MCAD deficiency, and oleic acid strongly reduced Na^+ , K^+ - ATPase activity, whereas palmitic acid had no effect. *In vivo* studies in rats have also shown the antioxidant effect of fatty acids in brain models can induce oxidative stress. A study evaluated the antioxidant efficacy of medium chain fatty acid (caprylic acid, capric acid and lauric acid) rich rice bran oils in comparison to rice bran oil in terms of altered biochemical parameters of oxidative stress following sodium arsenite treatment in rats. It was verified that the caprylic acid rich rice bran oil showed the best ameliorative effects [23]. However, the FRAP assay for fatty acids was not used for this purpose and was reported for the first time in this study. Thus, we did not find results of antioxidant activity in $\mu\text{mol L}^{-1}$ for comparison in the literature.

The antimicrobial activity of aliphatic fatty acids has been recognized for a long time [11]. Kabara et al. [24] has shown the structural relationship of thirty straight-chain fatty acids and derivatives and their bactericidal properties against eight gram-negative and twelve gram-positive organisms. These authors have indicated that lauric acid (MIC ranges of $0.062 - 2.45 \mu\text{mol mL}^{-1}$) was the most inhibitory saturated fatty acid against different microorganisms. Hellgren & Vincent [25] reported increased fungistatic activity of skin surface lipids in the presence of antioxidants. Lyddon et al. [26] suggested short chain fatty acids in the treatment of dermatophytoses. In our study, MIC values varied for different fatty acids versus *Cryptococcus* ssp. (table 2). The best MIC values were observed for lauric acid ($0.09 - 0.80 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$), capric acid ($0.19 - 0.80 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) and undecylenic acid ($0.38 - 2.94 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$). Souza et al [11] reported antifungal activity of capric acid ($0.6 - 1.2 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$),

caprylic acid ($0.3 - 1.2 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) and lauric acid ($0.3 - 0.6 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) against different *Candida* species. The authors attributed the difference in activity to the compounds due to their chain length because saturated fatty acids with 10 or 12 carbons in their chain tend to exhibit the best antimicrobial activity. As in our study the authors pointed to lauric acid as having the best antifungal activity. Few studies have demonstrated antifungal activity of fatty acids against *Cryptococcus* species. Carballeira et al. [27] tested the 2,6-hexadecadioxy acid disclosing as the best overall antifungal activity against *Cryptococcus neoformans* ATCC 66031 (MIC $<5.7 \mu\text{M}$). Subsequently, it showed that ($\pm$)-4-methoxydecanoic acid had higher antifungal activity with MIC of 1.5 mM against *Cryptococcus neoformans*. The mechanism of action to explain the antifungal effect of fatty acids has been proposed by the study of undecylenic acid in *Candida albicans*. This acid inhibits the conversion of yeast into hyphae (which are associated with active infection) via inhibition of fatty acid biosynthesis. The mechanism of action and efficacy of fatty acid antifungals depends on the number of carbon atoms in the chain, with the effectiveness increasing along the number of atoms in the chain [28, 29]. Recently, it has been investigated antifungal mechanisms of undecylenic acid by evaluating the virulence factors of *C. albicans* during biofilm formation. Undecylenic acid inhibits biofilm formation of *C. albicans* effectively with 3 mM optimal concentration [10].

Fig. 2 shows the growth of *Cryptococcus* species in the SSF in 72 hours. It was observed that SSF *C. neoformans*, *C. gattii* and *C. grubii* were able to grow significantly in the incubation time. SSF was initially proposed by Lofsness & Jensen [16] as a form of student training for CSF analysis. According to the authors, the method for preparing this solution is simple, inexpensive, and requires only equipment that is readily available to the teaching laboratory. In addition, cell counting and identification techniques are possible for glucose and total protein analyzes. From the preparation of SSF we suggest to use this in the attempt to perform the simulated growth of *Cryptococcus in vitro*, which could occur if this fungal could grow under these conditions. The SSF model showed to be promising, since the three fungi investigated grew significantly within a few hours after inoculation. Some models have been proposed to simulate the cerebrospinal fluid. Shiobara et al. [30] obtained marketing approval for commercially available ACSF (ARTCEREB) from the Japanese Ministry of Health. Stott et al. [31] reported the development of cerebrospinal fluid penetration to study the activity of fluconazole in adults with

Cryptococcus meningitis. However, the use of SSF to study antifungal activity of *in vitro* fatty acids against *Cryptococcus* species has not been reported to date. To our knowledge this study is the first to use such a model for this purpose. After the evidence *Cryptococcus* species of growth in the SSF by the curves of determination of each fungus and by the determination of the MICs for each fatty acid, three concentrations defined as ($\frac{1}{2}$ MIC, MIC and 2xMIC) were fixed. The concentrations were used for the evaluation of the antifungal activity of the fatty acids after inoculation of the *Cryptococcus* in the SSF. As described in the results, only lauric acid was able to inhibit the three *Cryptococcus* species at the concentrations and times tested. This indicates a possible fungicidal activity of this compound against the species of *Cryptococcus*. The activity of eicosanoic acid and 2-amino-3,4-dihydroxy-2-25 (hydroxymethyl)-14-oxo-6,12-eicosenoic acid was evaluated against *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*. The minimal inhibitory concentration (MIC) values were 0.49 - 7.82 and 0.48 - 1.95 μ M, respectively [14]. Souza et al. [11] also reported lauric acid activity against different *Candida* species. The ability to inhibit *Candida* mycelia growth by medium chain fatty acids, *in vitro* and its therapeutic efficacy in murine oral candidiasis was evaluated by Takahashi et al. [12]. In this study four fatty acids were used and inhibited not only the mycelial but also the yeast-form growth of *Candida albicans*. Capric acid and caprylic acid inhibited *Candida* mycelia growth at very low concentrations (more than 48.8 μ M).

The antimicrobial activity of capric acid, lauric acid and alpha-linolenic acid on *Staphylococcus aureus* was studied in relation to their effect on the new fatty acid biosynthesis. The results suggested that fatty acids pathway is the major target of alpha-linolenic acid in *S. aureus* response [32]. Huang et al. [13] evaluated the antibacterial activity of short-, medium-, and long-chain fatty acids against various oral microorganisms. The authors observed that the fatty acids exhibited patterns of inhibition against oral bacteria with some specificity that appeared to be related to the bacterial species that are the general structural characteristics of the microorganism. Fatty acids were much less effective against *C. albicans* than to the oral bacteria, with limited effectiveness to hexanoic, octanoic, and lauric acids. In our study, interesting antifungal activities of undecylenic acid, capric acid and caprylic acid were also observed in SSF. The acids were able to inhibit the growth of *C. neoformans* in some concentrations as well as the total inhibition in the growth of *C. grubii* and *C. gattii* (table 3). In the present study, undecylenic acid has been used for the

treatment of dermatitis [33], dermatomycoses [34], as well as antiviral [35] and antifungal agents [29], antibiofilm [11, 15, 37]. The antifungal characteristics of undecylenic acid have been reported for a long time and are approximately six times more effective than caprylic acid [38].

From the measurements of glucose and proteins in SSF after inoculation of the fungi and treatment with the concentrations of each fatty acid ($\frac{1}{2}$ MIC, MIC and 2x MIC) the biochemical determinations were carried out at different incubation times (0, 24, 48 and 72 hours). In **Fig. 3, 4** and **5** it was possible to observe the results for the fatty acids tested against *C. neoformans*, *C. grubii* and *C. gattii*. As observed, glucose and protein levels reduce significantly in some concentrations tested. However, most of the tested concentrations did not display altered glucose and protein levels. This demonstrates that fatty acids at certain concentrations have antifungal activity similar to the presented by amphotericin B. Amphotericin also did not alter glucose and protein levels due to its fungicidal activity against the tested *Cryptococcus* species. We did not observe results using the SSF model, so we do not have data for comparison. What are known are questions related to the biochemical values in cerebrospinal fluid when a fungal infection of the genus *Cryptococcus* occurs. According to Recio et al. [39] reference values for the normal cerebrospinal fluid (CSF) and glucose would be 40 to 70 mg per deciliter, and the protein level from 15 to 45 mg per deciliter. In cases of fungal infection, glucose values lower and the protein values are higher. Studies have highlighted the importance of *C. neoformans* infections in immunocompromised patients [36, 40] in a pediatric patient in the intensive care unit suspected of having fungal meningitis [41].

These patients may present a biochemical profile of the CSF with alterations on biochemical parameters due to fungal meningitis. Therefore, fatty acids present potential antifungal activity and could be useful in further studies to develop more effective combination therapies with amphotericin B and reducing side effects in patients [14]. Thus, we believe that the SSF model can also be constructive for the study of the antifungal activity of other bioactive compounds besides fatty acids *in vitro*.

5. Conclusion

These results suggest that all four fatty acids, especially lauric acid, have potential as substances supporting *Cryptococcus* species treatment. SSF seems to be an interesting alternative for the *in vitro* study of antifungal activity. Therefore, the potential use of these fatty acids could be the basis for more antimicrobial and biochemical tests.

Funding

Current research was funded by CNPq, FAPERGS, CAPES and UFPel.

Acknowledgments

The current research was funded by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Foundation of Amparo Research of Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordination for the Improvement of Higher Level (CAPES) and Federal University of Pelotas.

6. Reference

- [1] Ikeh, m.; Ahmed, Y.; Quinn, J. Phosphate Acquisition and Virulence in Human Fungal Pathogens. *Microorganisms*, 2017; v.5, n. 48.
- [2] Perfect, J. R.; Bicanic, T. Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now. *Fungal Genetics and Biology*, 2015; v.78, p. 49–54.
- [3] Maziarz, E. K.; Perfect, J. R. Cryptococcosis. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 30, n. 1, p. 179–206, 2016.
- [4] Velagapudi R, Hsueh YP, Geunes-Boyer S, Wright JR, Heitman J. Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 2009 Oct; 77(10):4345-55.
- [5] Trevijano-Contador N, Rossi SA, Alves E, Landín-Ferreiroa S, Zaragoza O. Capsule Enlargement in *Cryptococcus neoformans* Is Dependent on Mitochondrial Activity. *Front Microbiol*. 2017 Jul 31;8:1423.
- [6] Kanafani ZA, Perfect JR. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin Infect Dis*. 2008 Jan 1;46(1):120-8.

- [7] Williamson PR, Jarvis JN, Panackal AA, Fisher MC, Molloy SF, Loyse A, Harrison TS. Cryptococcal meningitis: epidemiology, immunology, diagnosis and therapy. *Nat Rev Neurol*. 2017; Jan;13(1):13-24.
- [8] Desbois AP, Smith VJ. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;85(6):1629–42.
- [9] Pohl, C. H.; Kock, J. L. F.; Thibane, V. S. Antifungal free fatty acids: a review. In: Méndez-Vilas A, Ed. *Science against microbial pathogens: Communicating current research and technological advances*, Badajoz: Formatex, v. 1, p. 61-71, 2011.
- [10] Shi D, Zhao Y, Yan H, Fu H, Shen Y, Lu G, Mei H, Qiu Y, Li D, Liu W. Antifungal effects of undecylenic acid on the biofilm formation of *Candida albicans*. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2016 May;54(5):343-53.
- [11] Juliana L.S. Souza, Adriana F. da Silva, Pedro H.A. Carvalho, Bruna S. Pacheco, Cláudio M.P. Pereira, Rafael G. Lund. Aliphatic fatty acids and esters: Inhibition of growth and exoenzyme production of *Candida*, and their cytotoxicity in vitro Anti-*Candida* effect and cytotoxicity of fatty acids and esters. *Archives for Oral Biology*, 2014:880-886.
- [12] Takahashi M, Inoue S, Hayama K, Ninomiya K, Abe S. Inhibition of *Candida mycelia* growth by a medium chain fatty acids, capric acid in vitro and its therapeutic efficacy in murine oral candidiasis. *Med Mycol J*. 2012; 53(4):255-61.
- [13] Huang CB, Alimova Y, Myers TM, Ebersole JL. Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. *Arch Oral Biol*. 2011 Jul; 56(7):650-4.
- [14] Pereira CB, Pereira de Sá N, Borelli BM, Rosa CA, Barbeira PJS, Cota BB, Johann S. Antifungal activity of eicosanoic acids isolated from the endophytic fungus *Mycosphaerella* sp. against *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*. *Microb Pathog*. 2016 Nov; 100:205-212.
- [15] Petrović M, Bonvin D, Hofmann H, Mionić Ebersold M, Dorko E, Kmetová M, Dorko F, Bracoková I, Danko J, Svický E, Tkáčiková L. Fungicidal PMMA-Undecylenic Acid Composites. *Int J Mol Sci*. 2018 Jan 8;19(1).
- [16] Lofsness KG, Jensen TL. The preparation of simulated spinal fluid for teaching purposes. *Am J Med Technol*. 1983 Jul;49(7):493-6.
- [17] Cunha JA, Bolzan LP, Fausto VP, Scheid G, Scheeren CA, Madalosso RG, Heinzmann BM, Giongo JL, Vaucher, RA. Characterization and antifungal activity of the essential oil of *Tagetes minuta* front of the *Cryptococcus* spp. isolates from the environment. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2016, v. 8, p. 390-392.
- [18] Benzie I, Strain J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, Academic Press, n. 299, p. 15–27, 1999.

- [19] Clinical and Laboratory Standards Institute Document M27- A3 Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard. 3rd ed.; 2008.
- [20] Sucupira, N. R., Silva, A. B., Pereira, G., Costa, J. N. Methods for determining the antioxidant activity of fruits. *Cient Ciênc Biol Saúde*, 2012, v. 14, (4): 263-269.
- [21] Henry GE, Momin RA, Nair MG, Dewitt DL. Antioxidant and cyclooxygenase activities of fatty acids found in food. *J Agric Food Chem*. 2002 Apr 10;50(8):2231-4.
- [22] de Assis, DR, Ribeiro, CA, Rosa, RB, Schuck, PF, Dalcin, KB, Vargas, CR, Wannmacher, CM, Dutra-Filho, CS, Wyse, AT, Briones, P, Wajner, M. Evidence that antioxidants prevent the inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity induced by octanoic acid in rat cerebral cortex in vitro. *Neurochem Res*. 2003 Aug; 28(8):1255-63.
- [23] Sengupta A, Ghosh M, Bhattacharyya DK. Antioxidative effect of rice bran oil and medium chain fatty acid rich rice bran oil in arsenite induced oxidative stress in rats. *J Oleo Sci*. 2014; 63(11):1117-24.
- [24] Kabara JJ, Swieczkowski DM, Conley AJ, Truant JP. Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 1972 Jul; 2(1):23-8.
- [25] Hellgren L, Vincent J. Increased fungistatic activity of skin surface lipids in the presence of antioxidants. *Mycopathol Mycol Appl*. 1972 Dec 15; 48(4):335-7.
- [26] Lyddon FE, Gundersen K, Maibach HI. Short chain fatty acids in the treatment of dermatophytoses. *Int J Dermatol*. 1980 Jan-Feb; 19(1):24-8.
- [27] Carballeira NM¹, Sanabria D, Cruz C, Parang K, Wan B, Franzblau S. 2,6-hexadecadiynoic acid and 2,6-nonadecadiynoic acid: novel synthesized acetylenic fatty acids as potent antifungal agents. *Lipids*. 2006 May;41 (5):507-11.
- [28] Steven S, Hofemyer JHS. Effects of ethanol, octanoic and decanoic acids on fermentation and the passive influx of protons through the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1993;38:356-363.
- [29] McLain N, Ascanio R, Baker C, Strohaber RA, Dolan JW. Undecylenic acid inhibits morphogenesis of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Oct; 44(10):2873-5.
- [30] Shiobara R, Ohira T, Doi K, Nishimura M, Kawase T. Development of Artificial Cerebrospinal Fluid: Basic Experiments, and Phase II and III Clinical Trials. *J Neurol Neurophysiol*. (2013) 4:173.
- [31] Stott KE, Beardsley J, Kolamunnage-Dona R, Castelazo AS, Kibengo FM, Mai NTH, Day J, Hope W. Population Pharmacokinetics and Cerebrospinal Fluid Penetration of Fluconazole in Adults with Cryptococcal Meningitis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018 Aug 27; 62(9).

- [32] Sado-Kamdem SL, Vannini L, Guerzoni ME. Effect of alpha-linolenic, capric and lauric acid on the fatty acid biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. Int J Food Microbiol. 2009 Feb 28; 129(3):288-94.
- [33] Anguita JL, Escutia B, Marí JI, Rodríguez M, De La Cuadra J, Aliaga A. Allergic contact dermatitis from undecylenic acid in a commercial antifungal nail solution. Contact Dermatitis. 2002 Feb;46(2):109.
- [34] Shapiro AL, Rothman S. Undecylenic acid in the treatment of dermatomycoses. Arch Dermatol Syphilol 1945;52:166-171.
- [35] Bourne N, Ireland J, Stanberry LR, Bernstein DI. Effect of undecylenic acid as a topical microbicide against genital herpes infection in mice and guinea pigs. Antiviral Res. 1999 Jan; 40(3):139-44.
- [36] Rozenbaum R¹, Gonçalves AJ, Wanke B, Caiuby MJ, Clemente H, Lazera M dos S, Monteiro PC, Londero AT. *Cryptococcus neoformans* varieties as agents of cryptococcosis in Brazil. Mycopathologia. 1992 Sep; 119(3):133-6.
- [37] Gonçalves LM, Del Bel Cury AA, Sartoratto A, Garcia Rehder VL, Silva WJ. Effects of undecylenic acid released from denture liner on *Candida* biofilms. J Dent Res. 2012 Oct; 91(10):985-9.
- [38] Neuhauser I. Successful treatment of intestinal moniliasis with fatty acid-resin complex. Arch Intern Med 1954; 93:53-60.
- [39] Recio R, Perez-Ayala A. *Cryptococcus neoformans* Meningoencephalitis. N Engl J Med. 2018 Jul 19;379(3):281.
- [40] Daher Ede F, Nasseralla JC, Silva Junior GB, Oliveira AR, Medeiros Neto JU, Sousa AQ. Fatal disseminated Cryptococcosis with renal involvement in na HIV-infected patient. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2015 Jul-Aug;57(4):365-7.
- [41] Dorko E, Virágová S, Pilipcinec E, Tkáčiková L. Detection of anti-*Candida* antibodies in neonates from a Neonatal Intensive Care Unit. Folia Microbiol (Praha). 2002;47(3):297-301.

5 Conclusão

- A atividade antioxidante dos AGs alifáticos testados foi inferior a da Vitamina C, sendo que o ácido caprílico foi o que apresentou maior atividade no ensaio FRAP seguido do ácido láurico, undecilênico e cáprico, respectivamente;
- Os AGs alifáticos testados apresentaram Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) que variaram para as diferentes cepas de *Cryptococcus spp.* testadas. O ácido undecilênico e láurico foram os que apresentaram menores CIM para as espécies de *Cryptococcus* testadas;
- A padronização do modelo do fluído espinal simulado (FES) foi realizada com sucesso já que as diferentes espécies de *Cryptococcus* que foram inoculadas obtiveram crescimento satisfatório dentro de 72 h de cultivo.
- Nas diferentes concentrações dos ácidos testados (1/2 CIM, CIM e 2x CIM) em FES, foi possível verificar que apenas o ácido láurico foi capaz de inibir o crescimento do *C. neoformans*, *C. grubii* e *C. gattii*. Nessas concentrações este ácido apresenta atividade fungicida. Já os ácidos cáprico, caprílico e undecilênico, por não terem inibido totalmente o crescimento dos fungos no FES, apresentaram atividade fungicida somente para algumas concentrações.
- Os testes de glicose e proteínas totais demonstraram uma capacidade interessante para o monitoramento do crescimento fúngico das espécies de *Cryptococcus* no FES. Quando o crescimento foi inibido pelas concentrações de AGs testados, evidenciou-se que não ocorreram modificações significativas em relação a controle com Anfotericina B, comprovando assim, a atividade antifúngica dos AGs testados no FES.
- O FES pode ser considerado uma alternativa interessante para o monitoramento da atividade de novos compostos bioativos para a avaliação da atividade antifúngica *in vitro*. Contudo, um estudo com a ampliação de um maior número de parâmetros bioquímicos deve ser realizado. Um parâmetro que também poderia ser investigado seria o lactato.

Referências

- ABASSI, M.; BOULWARE, D. R.; RHEIN, J. Cryptococcal Meningitis: Diagnosis and Management Update. **Curr Trop Med Rep.**, v. 2, n. 2, p. 90–99, 2015.
- ARAUJO JUNIOR, E. C.; TAPARO, C.V.; UCHIDA, C. Y. et al. *Cryptococcus*: isolamento ambiental e caracterização bioquímica. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.67, n. 4, p.1003–1008, 2015.
- ANZAKU, A. A.; AKYALA, J. I.; JULIET, A.; OBIANUJU, E. C. Antibacterial Activity of Lauric Acid on Some Selected Clinical Isolates. **Ann Clin Lab Res.**, v. 5, n. 2, p. 1–5, 2017.
- BALTAZAR, L. M.; RIBEIRO, M. A. Primeiro isolamento ambiental de *Cryptococcus gattii* no Estado do Espírito Santo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 5, p. 449 – 453, 2008.
- BICANIC, T.; HARRISON, T. S. Cryptococcal meningitis. **British Medical Bulletin**, v. 72, n. 1, p. 99–118, 2005.
- BONGOMIN, F.; GAGO, S.; OLADELE, R. O.; DENNING, D. W. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. **J. Fungi**, v. 3, n. 57, p. 1–29, 2017.
- CHATTERJEE, S.; TATU, U. Heat shock protein 90 localizes to the surface and augments virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 11, n. 8, 2017.
- CHEN, L-C.; BLANK, E. S.; CASADEVALL, A. Extracellular Proteinase Activity of *Cryptococcus neoformans*, **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 3, n. 5, p. 570–574, 1996.
- COMAR, S. R.; MACHADO, N. A.; DOZZA, T. G.; HAAS. P. Análise citológica do líquido cefalorraquidiano. **Estudo Biol.** 31 (73/74/75), p. 93–102, 2009.
- COOVADIA, Y. M. C.; MAHOMED, S.; DORASAMY, A.; CHANG, C. A comparative evaluation of the Gram stain and India ink stain for the rapid diagnosis of cryptococcal meningitis in HIV infected patients in Durban. **South Afr J Infect Dis.**, v. 30, n. 2, p. 61-63, 2015.
- CORREA, N.; COVARRUBIAS, C.; RODAS, P. I.; HERMOSILLA, G.; OLATE, V. R.; VALDÉS, C.; MEYER, W.; MAGNE, F.; TAPIA, C. V. Differential Antifungal Activity of Human and Cryptococcal Melanins with Structural Discrepancies. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 1292, 2017.
- COX, G. M; MUKHERJEE, J.; COLE, G. T.; CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. Urease as a virulence factor in experimental Cryptococcosis. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 443–448, 2000.

COX, G. M.; McDADE, H. C.; CHEN, S. C.; TUCKER, S. C.; GOTTFREDSSON, M.; WRIGHT, L. C.; SORRELL, T. C.; LEIDICH, S. D.; CASADEVALL, A.; GHANNOUM, M. A.; PERFECT, J.R. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. **Molec. Microbiol.**, v. 39, n.1, p. 166–175, 2001.

DE ASSIS, D. R.; RIBEIRO, C. A.; ROSA, R. B.; SCHUCK, P. F.; DALCIN, K. B.; VARGAS, C. R.; WANNMACHER, C. M.; DUTRA-FILHO, C. S.; WYSE, A. T.; BRIONES, P.; WAJNER, M. Evidence that antioxidants prevent the inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity induced by octanoic acid in rat cerebral cortex *in vitro*. **Neurochem Res.**, v. 28, n. 8, p. 1255–1263, 2003.

DEBMANDAL, M.; MANDAL, S. Coconut (*Cocos nucifera* L. arecaceae): In health promotion and disease prevention. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 241-247, 2011.

DESBOIS, A. P.; SMITH, V. J. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 85, n. 6, p. 1629–42, 2010.

ELMORE, L. K.; GWEN, N.; SINGLETON, S.; LORENZ, L. Treatment of Dermal Infections with Topical Coconut Oil. **Nat. Med.**, v. 6, n. 5, p. 1-10, 2014.

ESPINEL-INGROFF, A.; ALLER, A. I.; CANTON, E.; CASTAÑÓN-OLIVARES, R. J. et al. *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 56, n. 11, p. 5898–5906, 2012.

FIRACATIVE, C.; LIZARAZO, J.; ILLNAIT-ZARAGOZÍ, M. T.; CASTAÑEDA, E. The status of cryptococcosis in Latin America. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, p. 1– 23, 2018.

FRANZOT, S. P; SALKIN, I. F.; CASADEVALL, A. F. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, a separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 37, p. 838–840, 1999.

FREI, B. Efficacy of dietary antioxidants to prevent oxidative damage and inhibit chronic disease. **J utr.**, v.134, n. 11, p. 3196S–3198S, 2004.

GILES, S. S.; STAJICH, J. E.; NICHOLS, C.; GERRALD, Q. D.; ALSPAUGH, J. A.; DIETRICH, F.; PERFECT, J. R. The *Cryptococcus neoformans* catalase gene family and its role in antioxidant defense. **Eukaryot. Cell**, v. 5, p. 1447–1459, 2006.

GHANNOUM, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 1. p.122–143, 2000.

HAGEN, F., KHAYHAN, K., THEELEN, B., KOLECKA, A., POLACHECK, I., SIONOV, E., et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal Genet.Biol.**, n. 78, p.16–48, 2015.

HENRY, G. E.; MOMIN, R. A.; NAIR, M. G.; DEWITT, D. L. Antioxidant and cyclooxygenase activities of fatty acids found in food. **J Agric Food Chem.**, v. 50, n. 8, p. 2231–2234, 2002.

HUANG, C. B.; ALIMOVA, Y.; MYERS, T. M.; EBERSOLE, J. L. Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. **Arch Oral Biol.**, v. 56, n. 7, p. 650-654, 2011.

IKEH, M.; AHMED, Y.; QUINN, J. Phosphate Acquisition and Virulence in Human Fungal Pathogens. **Microorganisms**, v. 5, n. 48, 2017.

JERRARD, D. A.; HANNA, J. R.; SCHINDELHEIM, G. L. Cerebrospinal fluid. **J Emerg Med.**, v. 21, n. 2, p. 171–178, 2001.

JOHANSON, C. E.; DUNCAN III, J. A.; KLINGE, P. M.; BRINKER, T.; STOPA E. G.; SILVERBERG, G. D. Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: new challenges in health and disease. **Cerebrospinal Fluid Research**, v. 5, n. 10, 2008.

KABARA, J. J.; SWIECZKOWSKI, D. M.; CONLEY, A. J.; TUANT, J. P. Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. 2, p. 23–28, 1972.

KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 1, p. 120–8, 2008.

KIDWAI, M.; VAISHALI; PODDAR, R. Lipase catalysed substituted coumarins with antioxidant activity. **Indian J Chem.**, v. 50B, p. 715-720, 2011.

KON, A. S.; GRUMACH, A. S.; COLOMBO, A. L.; PENALVA, A. C. O.; WANKE, B.; TELLES, F. A.; SEVERO, L. C.; ARANHA, L. F.; LAZÉRA, M. S.; RESENDE, M. R.; SALMITO, M. A.; YASUDA, M. A. S.; MOREHI, M. L.; FERREIRA, M. S.; VERGARA, M. L. S.; ANDRADE, N. M. P.; TRABASSO, P.; MENDES, R. P.; MARTINEZ, R.; PONZIO, V. Consenso em criptococose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n.5, p. 524-544, 2008.

KRONSTAD, J. W.; ATTARIAN, R.; CADIEUX, B.; CHOI, J.; D'SOUZA, C. A.; GEDDES, J. M. H.; HU, G.; JUNG, W. H.; KRETSCHMER, M.; SALKIA, S.; WANG, J. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic Box. **Nature** n. 9, p. 193–203, 2011.

KRONSTAD, J. W.; JUNG, H.; HU, G. Beyond the Big Three: Systematic Analysis of Virulence *Cryptococcus neoformans*. **Cell Host & Microbe**.v.4, n. 4, p. 308–310, 2008.

KWON-CHUNG, K. J.; FRASER, J. A.; DOERING, T. L.; ZHOU WANG,Z.; JANBON, G.; IDNURM, A.; BAHN, Y. S. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 2014.

KWON-CHUNG, K. J.; RHODES J. C. Encapsulation and Melanin Formation as Indicators of Virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 51, n. 1, p. 218–223, 1986.

KWON-CHUNG, K.J; VARMA A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? **FEMS Yeast Res.** v. 6, n. 4, 574–584, 2006.

KWON-CHUNG, K.J.; WICKES, B. L.; BOOTH, J.C. Urease inhibition by EDTA in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 8, 1751–1754, 1987.

LANIADO-LABORÍN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 4, p. 223–227, 2009.

LEE, J-H.; JO, Y-W. Antimicrobial Effect of a Lauric Acid on *Streptococcus Mutans* Biofilm. *Annals of International Medical and Dental Research*, v. 2, n. 4, p. 60–65, 2016.

LEITE, A. A.; HONÓRIO, S. R.; TORRES, G. R.; ERRANTE, P. R. Analysis of Cerebrospinal Fluid. *Atas de Ciências da Saúde*, v. 4, n. 3, p. 1–24, 2016.

LI, X. C.; JACOB, M. R.; KHAN, S. I.; ASHFAQ, M. K.; BABU, K. S.; AGARWAL, A. K.; ELISOHLY, H. N.; MANLY, S. P.; CLARK, A. M. Potent *in vitro* antifungal activities of naturally occurring acetylenic acids. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, p. 2442–2448, 2008.

LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annual review of microbiology**, v. 60, p. 69–105, 2006.

LOFSNESS, K. G.; JENSEN, T.L. The preparation of simulated spinal fluid for teaching purposes. *Am J Med Technol*, n. 49, p. 493–497, 1983. *In*: Strasinger, S. K.; Di Lorenzo, M. S. **Urinálise e Fluidos Corporais**. 5ª ed.– São Paulo: Livraria Médica, Editora, p. 211–212, 2009.

MACHADO, L. R.; LIVRAMENTO, J. A.; VIANNA, L. S Cerebrospinal fluid analysis in infectious diseases of the nervous system: when to ask, what to ask, what to expect. **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, v. 71, n. 9B, p.693–698, 2013.

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

MAZU, T. K.; BRICKER, B. A.; FLORES-ROZAS, H.; ABLORDEPPEY, S. Y. The Mechanistic Targets of Antifungal Agents: An Overview. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 7, p. 555–578, 2016.

MAY, R. C.; STONE, N. R.; WIESNER, D. L.; BICANIC, T.; NIELSEN, K. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nature Reviews in Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 106–117, 2016.

MCFADDEN, D. C.; CASADEVALL, A. Capsule and melanin synthesis in *Cryptococcus neoformans*. **Med. Mycol.** v. 39, n. 1, p. 19–30, 2001.

MCLAIN, N.; ASCANIO, R.; BAKER, C.; STROHAVER, R. A.; DOLAN, J. W. Undecylenic acid inhibits morphogenesis of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 44, n. 10, p. 2873–2875, 2000.

MELO, C. L; MARTINS, A. M. C; MARTINS, R. D.; QUEIROZ, M. G. R. Análise laboratorial do líquido cefalorraquidiano. **RBAC**, v. 35, n. 3, p. 109–112, 2003.

MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the Era of AIDS—100 Years after the Discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 4, p. 515–548, 1995.

MOHAMMAD, A.; FARAQI, F.; MUSTFA, J. Synthesis, spectroscopic and anti-cancer studies of fatty acid analogue of 2, 6-Diisopropylphenol. *Scholars Research Library, Der Pharma Chemica*, v. 2, p. 37–43, 2010.

MÜLLER, M.; NISHIZAWA, M. Cryptococcosis and its importance in Veterinary Medicine. **Journal of Continuing Education in Animal Science of CRMV-SP**, v. 15, n. 1, p. 24–29, 2017.

NAKATSUJI, T.; KAO, M. C.; FANG, J. Y.; ZOUBOULIS, C. C.; ZHANG, L.; GALLO, R. L.; HUANG, C-M. Antimicrobial property of lauric acid against *Propionibacterium acnes*: its therapeutic potential for inflammatory acne vulgaris. **J Invest Dermatol.**; v. 129, n. 10, p. 2480 –2488, 2009.

NEUHAUSER I. Successful treatment of intestinal moniliasis with fatty acid-resin complex. **Arch Intern Med.**, v.93, p. 53–60, 1954.

NIKOLOV, A.; D. GANCHEV. Effect of zinc undecylenates on plant pathogenic fungi. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 16, p. 220–226, 2010.

PAL, M.; TESFAYE, S.; DAVE, P. Cryptococcosis: An Enigmatic Mycosis of Humans and Animals. **Journal of Environmental and Occupational Science**, v. 3, n. 1, p. 53–60, 2014.

PARK ,H-S; CHOW, E. W.; FU, C.; SODERBLOM, E. J.; MOSELEY, M. A; HEITMAN, J.; CARDENAS, M. E. Calcineurin targets involved in stress survival and fungal virulence. **PLoS Pathog.**, 12:e1005873, 2016.

PEDROSO, R. S.; CANDIDO, R. C. Diagnóstico laboratorial da criptococose. **NewsLab**, v. 14, p. 94–102, 2006.

PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. **FEMS Yeast Res**, v. 6, p. 463–468, 2006.

PERFECT, J. R.; BICANIC, T. Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 49–54, 2015.

PERFECT, J. R.; DISMUKES, W. E.; DROMER, F.; GOLDMAN, D. L.; GRAYBILL, J. R.; HAMILL, R. J. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis.**, v. 50, n. 3, 291–322, 2010.

PEREIRA, C. B.; PEREIRA DE SÁ, N.; BORELLI, B. M.; ROSA, C. A.; BARBEIRA, P. J. S.; COTA, B. B.; JOHANN, S. Antifungal activity of eicosanoic acids isolated from the endophytic fungus *Mycosphaerella* sp. Against *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*. **Microb Pathog.** n.100, p. 205–212, 2016.

PETROVIĆ, M.; BONVIN, D.; HOFMANN, H.; MIONIĆ EBERSOLD, M.; DORKO, E.; KMETOVÁ, M.; DORKO, F.; BRACOKOVÁ, I.; DANKO, J.; SVICKÝ, E.; TKÁČIKOVÁ, L. Fungicidal PMMA-Undecylenic Acid Composites. **Int J Mol Sci.** v.19, n. 184, p. 2–16, 2018.

POHL, C. H.; KOCK, J. L. F.; THIBANE, V. S. Antifungal free fatty acids: a review. In: **Méndez-Vilas A**, Ed. Science against microbial pathogens: Communicating current research and technological advances, Badajoz: Formatex, v. 1, p. 61–71, 2011.

PROESCHOLDT, M. G.; HUTTO, B.; BRADY, L. S.; HERKENHAN, M. Studies of cerebrospinal fluid flow and penetration into brain following lateral ventricle and cisterna magna injections of the tracer [14C]inulin in rat. **Neuroscience**, v. 95, n. 2, p. 577–592, 2000.

RAJASINGHAM, R.; RACHEL, M. S.; BENJAMIN, J. P.; JOSEPH, N. J.; NELESH, P. G.; TOM, M. C.; DENNING, D. W.; LOYSE, A.; BOULWARE, D. R. Global Burden of Disease of HIV-Associated Cryptococcal Meningitis: An Updated Analysis. **Lancet Infect. Dis.**, n. 17, 873–881, 2017.

RAYYAN, M., DEVLIEGER, H., JOCHUM, F., AND ALLEGAERT, K. Short-term use of parenteral nutrition with a lipid emulsion containing a mixture of soybean oil, olive oil, medium-chain triglycerides, and fish oil: a randomized double-blind study in preterm infants. **JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.**, v. 36, n. 1, p. 81S–94S, 2012.

RECIO R, PEREZ-AYALA, A. *Cryptococcus neoformans* - Meningoencephalitis. **N Engl J Med.** v. 379, n. 3, p. 281, 2018.

RHEDER, P. N.; GUYEN, T. T. A new concept in the treatment of onychomycosis with cyanoacrylate, undecylenic acid and hydroquinone. **Foot and Ankle Specialist.**, v.1, n. 2, p. 93–96, 2008.

ROSENBLATT, J.; REITZEL, R.A.; VARGAS-CRUZ, N.; CHAFTARI, A.M.; HACHEM, R.; RAAD, I. Caprylic and polygalacturonic acid combinations for eradication of microbial organisms embedded in biofilm. **Front. Microbiol.** v. 8, n. 1999, p. 1–8, 2017.

SABIITI, W.; MAY, R. C. Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Future microbiol.** v. 7, n. 11, p. 1297–1313, 2012.

SAKKA, L.; COLL, G.; CHAZAL, J. Review of the Literature: Anatomy and Physiology of Cerebrospinal Fluid. **European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases**, v. 128, p. 309–316, 2011.

SANGLARD, D. Emerging Threats in Antifungal-Resistant Fungal Pathogens. **Frontiers in Medicine**, v. 3, n. 11, 2016.

SEEHUSEN, D. A.; REEVES, M. M.; FOMIN, D. A. Cerebrospinal Fluid Analysis. **American Family Physician**, v. 68, n. 6, p. 1103–1108, 2003.

SENGUPTA, A.; GHOSH, M.; BHATTACHARYYA, D. K. Antioxidative effect of rice bran oil and medium chain fatty acid rich rice bran oil in arsenite induced oxidative stress in rats. **J Oleo Sci.**, v. 63, n. 11, p. 1117– 1124, 2014.

SHI, D.; ZHAO, Y.; YAN, H.; FU, H.; SHEN, Y.; LU, G. MEI, H.; QIU, YING; LI, D.; LIU, W. Antifungal effects of undecylenic acid on the biofilm formation of *Candida albicans*. **Int J Clin Pharmacol Ther**, v. 54, n. 5, p. 343–53, 2016.

SORRELL, T. C.; ELLIS, D.H. - Ecology of *Cryptococcus neoformans*. **Rev. Iberoamer. Micol.**, v. 14, p; 42–43, 1997.

SOUZA, J. L. S.; SILVA, A. F.; CARVALHO, P. H. A.; PACHECO, B. S.; PEREIRA, C. M. P.; LUND, R. G. Aliphatic fatty acids and esters: Inhibition of growth and exoenzyme production of *Candida*, and their cytotoxicity *in vitro* Anti-*Candida* effect and cytotoxicity of fatty acids and esters. **Archives of Oral Biology**, n. 59, p. 880–886, 2014.

STEVEN, S.; HOFEMYER, J. H. S. Effects of ethanol, octanoic and decanoic acids on fermentation and the passive influx of protons through the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 38, p, 356–363, 1993.

TAKAHASHI, M.; INOUE, S.; HAYAMA, K.; NINOMIYA, K.; ABE, S. Inhibition of *Candida mycelia* growth by a medium chain fatty acids, capric acid *in vitro* and its therapeutic efficacy in murine oral candidiasis. **Med Mycol J.**, v. 53, n. 4, p. 255–261, 2012.

TREVIJANO-CONTADOR, N.; ROSSI, S. A.; ALVES, E.; LANDÍN-FERREIROA, S.; ZARAGOZA, O. Capsule Enlargement in *Cryptococcus neoformans* is dependent on mitochondrial activity. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.

VAN DER STEEN, M.; STEVENS, C. V. Undecylenic acid: A valuable and physiologically active renewable building block from castor oil. **Chem Sus Chem**, v. 2, p. 692–713, 2009.

VELAGAPUDI, R.; HSUEH, Y. P.; GEUNES-BOYER, S.; WRIGHT, J. R.; HEITMAN, J. Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 10, p. 4345–4355, 2009.

VIEGAS, C. M.; ROSA, M., F.; SÁ-CORREIA, I.; NOVAIS, J., M. Inhibition of yeast growth by octanoic and decanoic acids produce during ethanolic fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 55, p. 21–28, 1989.

WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: Mechanism of action, **Infect. Immun.** v. 63, n. 8, p. 3131–3136, 1995.

WILLIAMSON, P. R.; JARVIS, J. N.; PANACKAL, A. A.; FISHER, M. C.; MOLLOY, S. F.; LOYSE, A.; HARRISON, T. S. Cryptococcal meningitis: epidemiology, immunology, diagnosis and therapy. **Nature Reviews Neurology**, v. 13, p. 13–24, 2017.

ZARAGOZA, O.; FRIES, B. C.; CASADEVALL, A. Induction of capsule growth in *Cryptococcus neoformans* by mammalian serum and CO₂. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 11, p. 6155–6164, 2003.

ZARAGOZA, O.; RODRIGUES, M. L.; DE JESUS, M.; FRASES, S.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Adv Appl Microbiol**, n. 68, p. 133–216, 2009.

ZUNT, J. R.; BALDWIN, K. J. Chronic and subacute meningitis. **Infectious diseases Continuum Lifelong Learning in Neurology**, v. 18, n. 6, p. 1290–1318, 2012.

Anexo

Anexo A – Comprovante de submissão do manuscrito a Revista *Microbial Pathogenesis*.

19/09/2018

Email – rodvaucher@hotmail.com

Successfully received: submission Simulated Spinal Fluid as a model for the study of the antifungal activity of aliphatic fatty acids against *Cryptococcus* species for *Microbial Pathogenesis*

MP

Microbial Pathogenesis <EvisSupport@elsevier.com>

Responder |

Hoje, 23:27

Você

This message was sent automatically. Please do not reply.

Ref: YMPAT_2018_1538

Title: Simulated Spinal Fluid as a model for the study of the antifungal activity of aliphatic fatty acids against *Cryptococcus* species

Journal: *Microbial Pathogenesis*

Dear Dr. de Almeida Vaucher,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in *Microbial Pathogenesis*. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into

EVISE® at: http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?_afcr=YMPAT and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Microbial Pathogenesis

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.