



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO**
CENTRO DE ESTUDOS
SUPERIORES DE CAXIAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIODIVERSIDADE,
AMBIENTE E SAÚDE

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO – UEMA
CENTRO DE ESTUDOS SUPERIORES DE CAXIAS - CESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE, AMBIENTE E
SAÚDE – PPGBAS**

ADRIANO DE OLIVEIRA SANTOS

**ANÁLISE DA SUSCETIBILIDADE DE *Cryptococcus neoformans* ISOLADOS DAS
FEZES DE *Columba livia* NO MUNICÍPIO DE CAXIAS MARANHÃO**

CAXIAS - MA

2025

ADRIANO DE OLIVEIRA SANTOS

**ANÁLISE DA SUSCETIBILIDADE DE *Cryptococcus neoformans* ISOLADOS DAS
FEZES DE *Columba livia* NO MUNICÍPIO DE CAXIAS MARANHÃO**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Universidade Estadual do Maranhão, como
parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Biodiversidade, Ambiente e
Saúde – PPGBAS, para a obtenção do título
Mestre em Biodiversidade, Ambiente e
Saúde.

Orientador: Dr. Francisco Laurindo da Silva.

CAXIAS - MA

2025

ADRIANO DE OLIVEIRA SANTOS

**ANÁLISE DA SUSCETIBILIDADE DE CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS
ISOLADOS DAS FEZES DE COLUMBA LIVIA NO MUNICÍPIO DE CAXIAS
MARANHÃO**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Biodiversidade, Ambiente e Saúde –
PPGBAS/CESC/UEMA, como parte
dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Biodiversidade,
Ambiente e Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Prof. Francisco
Laurindo da Silva.

Aprovado em 30/01/2025

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 FRANCISCO LAURINDO DA SILVA
Data: 03/02/2025 20:18:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Francisco Laurindo da Silva- (Orientador)
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)

Documento assinado digitalmente
 ELIANA CAMPELO LAGO
Data: 30/01/2025 10:02:30-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dr.^a Eliana Campêlo Lago
Universidade Estadual do Maranhão – UEMA

Documento assinado digitalmente
 JULIANA NADIELLE BARBOSA CUNHA
Data: 03/02/2025 14:32:58-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dr.^a Juliana Nadielle Barbosa Cunha
Centro Universitário de Ciências e Tecnologia do Maranhão – UniFacema

Dedico esta obra àqueles que acreditam no meu crescimento mais do que eu mesmo.

"O prazer no trabalho aperfeiçoa a obra."
(Aristóteles)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por me manter forte nos momentos em que achei que era impossível ficar de pé.

Meus sinceros agradecimentos ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco Laurindo da Silva, que, desde a graduação, me inspirou a seguir o caminho da pesquisa e, agora, na pós-graduação, me orientou com paciência e compreensão, transmitindo segurança para a realização dos experimentos e escrita deste trabalho.

Agradeço à minha esposa por tanta positividade e companheirismo e por acreditar no meu potencial, impulsionando-me a querer sempre mais e a persistir lutando por nossos sonhos. Amo você.

Agradeço à minha família por sempre torcer por mim.

Agradeço ainda aos meus professores da época da graduação, cujos nomes não mencionarei para não cometer injustiças ao esquecer algum. Vocês foram minha inspiração profissional e continuam me incentivando até hoje. Espero alcançar o nível de vocês.

Aos professores da pós-graduação, o meu muito obrigado, pois, apesar dos encontros breves, vocês me proporcionaram uma experiência enriquecedora.

Agradeço também à professora Dra. Laice Fernanda Gomes de Lima por toda a ajuda com a parte botânica deste trabalho.

RESUMO

O *Columba livia* foi introduzido no Brasil por volta do século XVI, sendo considerada uma espécie doméstica e, por possuir características sinantrópicas, torna-se facilmente um reservatório de agentes patogênicos, e uma fonte importante na cadeia de transmissão de patógenos, como a criptococose, que tem como agente etiológico o *Cryptococcus neoformans* ou *Cryptococcus gattii*, porém, em menor frequência. Globalmente, observam-se recorrências de criptococose durante a terapia de manutenção, e o acesso limitado a drogas facilita a adaptação desses microrganismos aos antifúngicos. No desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos, as plantas medicinais têm destaque, com pesquisas que apontam o potencial fungicida de diversas espécies, incluindo algumas típicas da região do Cerrado brasileiro. Esta pesquisa teve como objetivo analisar a suscetibilidade de isolados ambientais de *C. neoformans* obtidos de fezes de *C. livia*, frente a extratos vegetais brutos e a antifúngicos. A população do estudo foi composta por fezes de *Columba livia*, coletadas em ambientes urbanos no município de Caxias, Maranhão. Os isolados fúngicos foram identificados fenotipicamente por meio de provas bioquímicas e por microscopia. Os testes de sensibilidade frente a extratos vegetais foram realizados por meio da técnica da difusão em ágar Müller-Hinton, enquanto os testes com antifúngicos foram realizados através da técnica de difusão em disco. Das 36 amostras de fezes coletadas de *C. livia*, 69,44% apresentaram crescimento de colônias do fungo. Os testes de suscetibilidade das cepas de *C. neoformans* frente aos extratos vegetais brutos demonstraram sensibilidade variável. Os extratos A e B foram eficazes no controle das cepas de *C. neoformans*, e observou-se um elevado número de cepas de *C. neoformans* resistentes à anfotericina B e ao itraconazol. Assim, demonstrou-se que ambientes no quais existem depósitos de excrementos de *C. livia*, especialmente em áreas urbanas com fluxo de seres humanos são fontes para o crescimento e disseminação do *Cryptococcus neoformans*. As cepas fúngicas apresentaram padrão de resistência e suscetibilidade variados em relação aos extratos vegetais brutos e aos antifúngicos.

Palavras chaves: Antifúngicos; *Astronium urundeuva* (M.Allemão) Engl.; *Cecropia distachya* Huber.; *Columba livia*; *Cryptococcus gattii*; Extratos vegetais; *Hymenaea courbaril* L.

ABSTRACT

The *Columba livia* was introduced in Brazil around the sixteenth century, being considered a domestic species and, because it has synanthropic characteristics, it easily becomes a reservoir of pathogens, and an important source in the chain of transmission of pathogens, as cryptococcosis, which has as its etiological agent the *Cryptococcus neoformans* or *Cryptococcus gattii*, however, in a lower frequency. Globally, cryptococcosis recurrences are observed during maintenance therapy, and limited access to drugs facilitates the adaptation of these microorganisms to antifungal agents. In the development of new antifungal drugs, medicinal plants have been highlighted, with research pointing out the fungicidal potential of several species, including some typical of the Brazilian Cerrado region. This research aimed to analyze the susceptibility of environmental isolates of *C. neoformans* obtained from feces of *C. livia*, against crude plant extracts and antifungal agents. The study population was composed of feces of *Columba livia*, collected in urban environments in the city of Caxias, Maranhão. The fungal isolates were identified phenotypically by biochemical tests and microscopy. The tests of sensitivity to plant extracts were carried out using the technique of diffusion in agar Müller-Hinton, while the tests with antifungal agents were performed using the disc diffusion technique. Of the 36 stool samples collected from *C. livia*, 69.44% showed growth of colonies of the fungus. The susceptibility tests of *C. neoformans* strains against raw plant extracts showed variable sensitivity. Extracts A and B were effective in controlling the strains of *C. neoformans*, and a high number of strains of *C. neoformans* resistant to amphotericin B and itraconazole was observed. Thus, it was demonstrated that environments in which there are deposits of *C. livia* excreta, especially in urban areas with human flow are sources for the growth and dissemination of *Cryptococcus neoformans*. The fungal strains presented a pattern of resistance and susceptibility varied in relation to raw plant extracts and antifungals.

Keywords: Antifungal; *Astronium urundeuva* (M. Allemão) Engl.; *Cecropia distachya* Huber.; *Columba livia*; *Cryptococcus gattii*; Plant extracts; *Hymenaea courbaril* L.

LISTA DE SIGLAS

AFLP - Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado

CDB - Creatinina-Dextrose-Azul de Bromotimol

CrAg - Antígeno Criptocócico

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

ELISAs - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

FASL – Ligante Fas

GXM – Glucuronoxilomanano

GXMGal – Glucuronoxilomanogalactana

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

IGS – Sequências Espaçadoras Intergênicas

Kg - Quilograma

LA - Aglutinação em Látex

LAMIDI - Laboratório de Microbiologia e Imunologia de Doenças Infectoparasitárias

LCR - Líquido Cefalorraquidiano

Mg - Miligrama

NGS - Sequenciamento de Próxima Geração

NO - Óxido Nítrico;

SNC - Sistema Nervoso Central

TNF- α - Fatores de Necrose Tumoral Alfa

Var. – Variedade.

LISTA DE FIGURAS/IMAGENS

Figura 1. Diagrama do <i>Cryptococcus</i> ambiental e disseminação no hospedeiro.....	17
Figura 2. Localização com pontos de coletas de fezes de <i>C. livia</i> no município de Caxias, Maranhão, Brasil.	23
Figura 3. Gráfico representativo dos 12 pontos de coletas das fezes de <i>C. livia</i> (nomeados de A-M), com crescimento de leveduras de <i>Cryptococcus neoformans</i> . Caxias-MA. N=12.....	27
Figura 4. Crescimento de colônias de cepas de <i>Cryptococcus neoformans</i> em ágar sabourad dextrose. Caxias-MA, 2024.....	27
Figura 5. Demonstrativo dos halos de suscetibilidade de cepas de <i>C. neoformans</i> em relação aos extratos brutos dos vegetais. Caxias-MA, 2024.....	31
Figura 6. Teste de suscetibilidade com inibição e sensibilidade de cepas de <i>C. neoformans</i> frente aos antifúngicos Anfotericina B, Fluconazol, Itraconazol e Ketoconazol. Técnica de KIrB-Bauer. Caxias-MA, 2024.....	34

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 <i>Cryptococcus neoformans</i>	14
2.2 Criptococose	16
2.3 Clínica da criptococose.....	18
2.4 Terapêutica	19
2.5 Diagnóstico laboratorial.....	19
2.5 A biodiversidade como potencial para a descoberta de novos antimicrobianos	20
2.6 <i>Hymenaea courbaril</i> L.	22
2.7 <i>Astronium urundeuva</i> (M.Allemão) Engl.	22
2.8 <i>Cecropia distachya</i> Huber.....	23
3. METODOLOGIA.....	24
3.1 Tipo de pesquisa.....	24
3.2 Local de estudo	24
3.3 População de estudo	25
3.4 Isolamento e identificação fúngica	25
3.5 Identificação do <i>C. neoformans</i>	26
3.6 Avaliação da sensibilidade fúngica	26
3.6.1 Extratos vegetais brutos	26
3.6.2 Drogas sintéticas	27
3.7 Extratos vegetais	27
3.8 Análise estatística.....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 Isolamento e identificação fúngica	28
4.2 Resultados da Análise Estatística.....	30
4.3 Avaliação da sensibilidade fúngica – extratos vegetais brutos.....	30
4.4 Avaliação da sensibilidade fúngica – antifúngicos	33
5. CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS	37
ANEXOS 46	

1. INTRODUÇÃO

O *Columba livia* (Pombo-doméstico), foi introduzido no Brasil por volta do século XVI pelos Europeus e logo espalhou-se por todo o território nacional. Considerada como uma espécie doméstica, e possuindo características sinantrópicas, facilmente tornam-se reservatórios de agentes patogênicos. Sendo esse o fator, que coloca o *C. livia* entre as aves que apresentam grande problema à saúde pública (DA SILVA GOMES et al., 2020; VASCONCELOS et al., 2018).

A proliferação desses animais, provoca transtornos de ordem sanitária, aumentando o risco de exposição a patógenos, que são eliminados pelos excrementos dessas aves. O *C. livia* é responsável pela transmissão de diversas doenças, tais como a clamidiose, salmonelose, histoplasmose, toxoplasmose, microsporidiose e a criptococose, na qual é frequentemente descrita em todo o mundo (MOUTINHO et al., 2015; SANTOS et al., 2020; RODRIGUES; MORAES; DE MESQUITA, 2022). A presença dessas aves no ambiente peridomiciliar é relacionada com a ocorrência de infecções criptocócicas ainda em animais de estimação (DA SILVA GOMES et al., 2020).

A criptococose tem como agente etiológico o *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuillemin, uma levedura encapsulada, que foi isolada pela primeira vez em 1894 de um suco de pêssago por Sanfelice na Itália. No mesmo ano foi descrito por Busse o primeiro caso de criptococose, no qual isolou-se a levedura de uma cultura proveniente de uma lesão semelhante a um sarcoma na tíbia de um jovem infectado (KWON-CHUNG et al., 2014). Posteriormente, descobriu-se que a fonte mais importante para a manutenção desse fungo na natureza eram as fezes de *C. livia*, com o acúmulo de seus excrementos (Guano) favorecendo seu desenvolvimento (BUIRAGO-MEDINA et al., 2013).

Desde sua descoberta a criptococose tem sido amplamente estudada devido à sua relevância clínica, sendo uma infecção fúngica de alta morbidade e mortalidade (CHANG et al., 2024). Os pacientes que apresentam infecção disseminada e sintomática, geralmente são aqueles que se encontram em um estado imunológico comprometido, como é o caso da meningoencefalite criptocócica, que é mundialmente associada à infecção pelo HIV mas, ocorrendo ainda em outros casos de imunossupressão como em pacientes em tratamento prolongado com corticosteroides, transplante de órgãos, malignidade avançada, diabetes, sarcoidose e doença idiopática Linfocitopenia CD4 (KWON-CHUNG et al., 2014).

Além do *C. neoformans*, a criptococose pode ser causada por uma variedade do mesmo gênero, o *Cryptococcus gattii*, porém, em menor frequência. A estratégia

farmacológica para tratamento da infecção criptocócica é à base de antifúngicos sistêmicos, com a anfotericina B sendo a droga de primeira escolha, associada ou não a 5-fluorocitosina quando necessário a utilização de terapia de indução, e ainda, um triazol fungistático para a manutenção da terapia (CHANG et al., 2018).

Globalmente, o que se tem observado é que recorrências de criptococose durante a terapia de manutenção (CHANG et al., 2018). Essa crescente resistência das cepas está relacionada a ampla utilização desses antifúngicos na medicina, somando-se ao acesso limitado das drogas que possuem baixa toxicidade e eficácia clínica significativa, além da hibridização entre *Cryptococcus* spp. (BERMAS, GEDDES-MCALISTER, 2020; NAICKER et al., 2020; BASTOS et al., 2021).

O desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos, que sejam altamente seletivos para fungos e não tóxicos para os seres humanos, representam uma problemática, devido à similaridade entre as células fúngicas e dos mamíferos próximos por sua natureza eucariótica, logo, muitas moléculas com potencial toxicidade para os fungos também são para os demais hospedeiros humanos (BERMAS, GEDDES-MCALISTER, 2020). Na pesquisa por novos fármacos as plantas medicinais possuem seu destaque, com seu uso na medicina popular acompanhando o ser humano desde o princípio.

Diversos estudos demonstram o potencial fungicida de diversas espécies, e dentre essas, algumas que são típicas da região do cerrado brasileiro (CHAVES et al., 2018). Como as pertencentes ao gênero *Hymenaea* (Jatobá), cuja casca é utilizada para o tratamento empírico de diversas doenças (BARBOSA JUNIOR et al., 2015). E diversas espécies do gênero *Cecropia* (Embaúba), no qual já se identificou inúmeras propriedades farmacológicas derivadas de extratos (RIVERA-MONDRAGÓN et al., 2021). Além do gênero *Astronium*, com muitas espécies conhecidas popularmente como Aroeira, descrita na literatura com uso popular diverso e potencial farmacológico para o tratamento de doenças do aparelho respiratório, doenças da pele do tecido subcutâneo, e atividade antifúngica (OLIVEIRA et al., 2023; BONIFÁCIO et al., 2024).

O trabalho de pesquisa teve como questão norteadora: Qual o potencial efeito fungicida de extratos vegetais brutos de *Hymenaea courbaril* L., *Astronium urundeuva* (M. Allemão) Engl., e *Cecropia distachya* Huber frente a isolados de *Cryptococcus neoformans* das fezes de *Columba livia* no município de Caxias-Maranhão?

Esta pesquisa teve como objetivo analisar a suscetibilidade de isolados ambientais de *C. neoformans* obtidos de fezes de *C. livia*, frente a extratos vegetais brutos e a antifúngicos. E como específicos, isolar o *Cryptococcus neoformans* das fezes de *Columba livia*; além de

realizar a identificação fenotípica dos isolados de *C. neoformans*, e estabelecer o perfil de suscetibilidade frente aos extratos vegetais brutos.

Visando combater a resistência microbiana, em especial contra o *Cryptococcus neoformans*, devido ao aumento da resistência ao tratamento convencional, esses extratos vegetais podem ser uma possível saída para a descoberta de novas potenciais substâncias para a produção de fármacos que sejam seletivos para essa levedura, assim, este trabalho justifica-se pela necessidade da realização de testes de suscetibilidade frente a microrganismos em especial fungos utilizando extratos vegetais com potencial capacidade fungicida ou fungistática ao *Cryptococcus neoformans*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Cryptococcus neoformans*

Francesco Sanfelice ao isolar microrganismos de um suco fermentado de pêssego encontrou uma levedura, que era caracterizada pela sua forma de colônia única, o que influenciou a denominá-la assim de *Saccharomyces neoformans* (SRIKANTA; SANTIAGO-TIRADO; DOERING, 2014). No ano de 1984 Otto Busse descreveu o que seria o primeiro caso na literatura de criptococose, isso ao isolar uma cultura de leveduras derivada de uma lesão na tíbia de um jovem na qual se assemelhava a um sarcoma, denominando o agente causador dessa patologia de *Saccharomycosis hominis* (KWON-CHUNG et al., 2014).

Em um período próximo Curtis (Professor de patologia na faculdade de medicina de Lille, França) estudava um fungo semelhante quando percebeu uma diferença comparado ao descrito anteriormente, denominando este de *Saccharomyces subcutaneous tumefaciens* n. sp., cepa essa que futuramente seria denominada de *Cryptococcus gattii*, sendo, portanto, essa a primeira descrição na literatura de isolado dessa levedura (SRIKANTA; SANTIAGO-TIRADO; DOERING, 2014).

Anos mais tarde Vuillemin (1901) (Professor da faculdade de medicina de Nancy, França) ao estudar essas cepas determina que elas não possuíam a capacidade de fermentação de açúcar e a formação de ascósporos que são características de leveduras pertencentes ao gênero *Saccharomyces*, reclassificando-as e denominando assim como *Cryptococcus hominis* e *C. neoformans*, respectivamente (KWON-CHUNG et al, 2014). O resurgimento do *C. gattii* ocorreu no ano de 1970 onde uma cepa atípica de *C. neoformans* foi isolada de um paciente leucêmico e foi descrita como *C. neoformans* var. *gattii* (BOVERS; HAGEN; BOEKHOUT, 2008).

Atualmente as espécies pertencente ao gênero *Cryptococcus* formam um complexo de duas espécies, *C. Neoformans* e *C. gattii* divididas em sorotipos de A a D, sendo A e D para o *C. neoformans* e B e C para o *C. gatti*. O *C. neoformans* possui duas variedades, o *C. neoformans* var *grubii* e *C. neoformans* var *neoformans*, com o sorotipo A para a primeira e sorotipo D para a segunda (HAGEN et al., 2015).

Além dos sorotipos A e D, existe ainda um híbrido AD, como o isolado original descrito por Sanfelice (1885), que é mantido como CBS132, um híbrido de sorotipo AD (HAGEN et al., 2015), esse tipo de híbrido é mais comumente encontrado no continente africano, porém, sua proporção varia em todo o mundo inclusive nas américas, os isolados do tipo D são em grande maioria encontrados na Europa (DESNOS-OLLIVIER et al., 2015).

O *C. neoformans* e suas variedades *grubii* e *neoformans* são divergentes do *C. gattii* por seus cariótipos eletroforéticos, impressões digitais de DNA, sequências espaçadoras intergênicas (IGS) do DNA ribossômico, características fisiológicas e bioquímicas. Assim, o complexo de espécies *C. gattii/C. neoformans* é dividido em sete genótipos haploides e quatro híbridos (HAGEN et al., 2015). Com relação aos tipos moleculares, o *C. neoformans* foi agrupado em AFLP1/VNI e AFLP1A/VNII (*Cryptococcus neoformans* var. *grubii*), AFLP3/VNIII (híbrido) e AFLP2/VNIV (*C. neoformans* var *neoformans*), e o *C. gattii* com os dois sorotipos (B e C) agrupado nos tipos AFLP1/VGI, AFLP6/VGII, AFLP5/VGIII e AFLP7/AFLP10/VGIV (ALVES et al., 2016; HAGEN et al., 2015).

O complexo de espécies *C. neoformans* é amplamente disperso no meio ambiente, especialmente em solo enriquecido com excrementos de pombos ou pássaros gregários, e o *C. neoformans* var *neoformans* isolado mais comumente de excrementos de pombos, já os membros do complexo *C. gattii* possuindo como nicho ecológico primário várias espécies de árvores, estando presentes em cascas, cavidades e madeira em decomposição (REIS et al., 2021; VREULINK et al., 2017).

O *C. neoformans* var *grubii* que corresponde ao sorotipo A é o agente causador da criptococose (meningite criptocócica) mais comum no mundo, principalmente em pacientes imunossuprimidos pela AIDS, sendo sua prevalência consideravelmente maior que infecções por *C. gattii* (FANG; FA; LIAO, 2015).

Nas Américas existem poucos estudos relacionados a epidemiologia do *Cryptococcus*, no Brasil estima-se que a incidência média anual é de 2,4 a 4,5 casos de criptococose meníngea por milhão de habitantes com a taxa de mortalidade em torno de 73%, em outros países das Américas estima-se que a prevalência da criptococose está entre 10 a 76% dentre as

micoses mais constantes, tendo o *C. neoformans* VNI (var. *grubii*) com o tipo molecular mais encontrado em reservatórios ambientais (FIRACATIVE; MEYER; CASTAÑEDA, 2021).

Porém, a var. *neoformans* também tem sua contribuição epidemiológica nas américas, já descrita desde a década de 90 como demonstrado em um estudo realizado no Brasil por ROZENBAUM et al., (1992), no qual em isolados clínicos de *C. neoformans* de pacientes com criptococose disseminada em 88,23% das amostras eram de *C. neoformans* var. *neoformans* e somente 9,41% eram *C. gattii*. Outros pesquisadores também isolaram *C. neoformans* var *neoformas* do meio ambiente (LAZERA et al., 1996; MEDEIROS RIBEIRO et al., 2006; COLOMBO, G. et al, 2015).

E apesar dessa levedura possuir diferentes padrões de distribuição geográfica, todas as variedades foram isoladas em todos os continentes do globo. No Brasil observa-se que o perfil epidemiológico da criptococose por *C. gattii* concentra-se em grandes áreas da região Amazônica e do semiárido do Nordeste, enquanto a desencadeada por *C. neoformans* é mais prevalente nas regiões Sul e Sudeste. Observa-se ainda que a presença de diferentes cepas em ambientes diversos pode contribuir para infecções concomitantes, conforme já relatado em estudos que descreveram quadros clínicos decorrentes de infecções por duas variedades distintas (VNI e VNIV) (ANDRADE-SILVA et al., 2018; ALVES SOARES et al., 2019).

2.2 Criptococose

A criptococose é uma doença infecciosa causada por uma levedura encapsulada do gênero *Cryptococcus*, e apesar desse gênero de basidiomicetos possuir mais de 30 espécies distribuídas em todo o mundo, duas espécies se destacam por possuírem maior capacidade patogênica aos seres humanos, o *Cryptococcus neoformans* e o *Cryptococcus gattii* (MAZIARZ, 2016). Essas duas leveduras causam inflamação granulomatosa em muitos órgãos, não só em seres humanos, mas, também em animais domésticos (MAESTRALE, 2015).

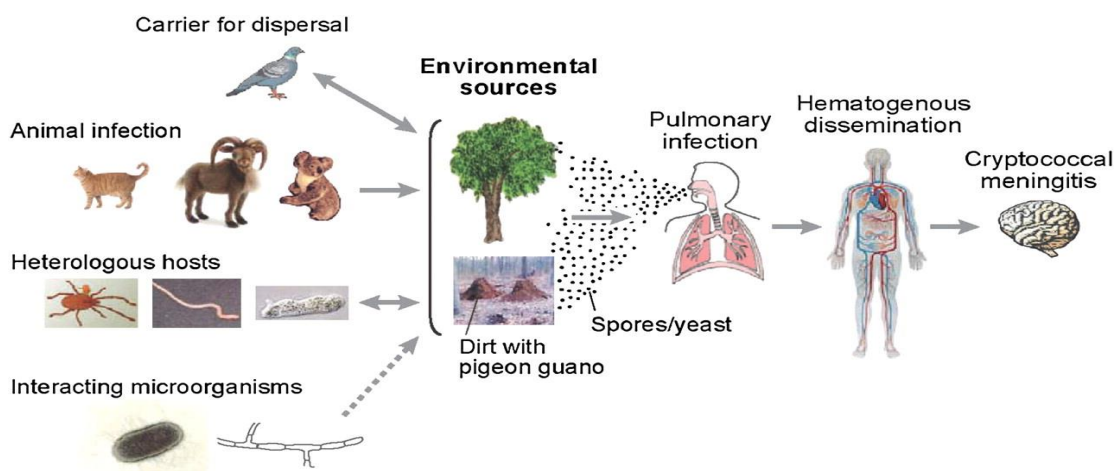
O *C. neoformans* é caracterizado pela capacidade de infectar tanto pacientes imunocomprometidos como hospedeiros aparentemente imunocompetentes. Já o *C. gattii* é considerado um patógeno que, ao longo da história possui uma maior capacidade de infectar hospedeiros imunocompetentes. No entanto, existe um consenso na literatura de que em condições preexistentes e estados de imunossupressão, mesmo que sejam defeitos imunológicos subclínicos, podem representar um risco para a infecção por ambas as espécies (MAZIARZ, 2016).

Em geral infecções causadas pelo *C. gattii* resultam em complicações neurológicas mais frequentes quando comparado com *C. neoformans* (FANG; FA; LIAO, 2015). Essa infecção fúngica de alta morbidade e mortalidade (CHANG et al., 2024), ocorre principalmente através da inalação de esporos do *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* na forma de levedura ou basidiósporos, de origem ambiental (ZAVALA; BADDLEY, 2020; LIU et al., 2016).

A infecção por essas cepas, compartilham características clínicas comuns, na criptococose pulmonar grande parte dos infectados são assintomáticos, e aqueles que apresentam sintomas podem apresentar quadros de tosse, dispneia, febre, suores noturnos, hemoptise e dor torácica pleurítica (NADROUS et al., 2003; HOWARD-JONES et al., 2022; HSIAO et al., 2022).

O gênero *Cryptococcus* não causa somente doença pulmonar, possuindo uma predileção pelo sistema nervoso central (SNC), tendo como manifestação clássica o desenvolvimento de meningoencefalite, uma condição potencialmente fatal, podendo ocorrer ainda infecções combinadas entre o SNC e pulmonar, além da possibilidade do desenvolvimento de uma forma sistêmica (HOWARD-JONES et al., 2022; DAY et al., 2013).

Figura 1. Diagrama do *Cryptococcus* ambiental e disseminação no hospedeiro.



Fonte: LI; MODY, 2010.

Dados da literatura descrevem a cápsula polissacarídica como o principal fator de virulência do *Cryptococcus*, aumentando de forma drástica durante uma infecção, ela fornece aos patógenos vantagens servindo como barreira contra a fagocitose por macrófagos do hospedeiro e auxilia as cepas engolfadas a sobreviverem intracelularmente, protegendo o patógeno contra espécies reativas de oxigênio e radicais livres dentro dos fagossomos, além

de complicar a resposta dos anticorpos (BOODWA-KO, DOERING, 2024; ZAVALA, BADDLEY; 2020).

A cápsula é composta principalmente por glucuronoxilomanano (GXM), e em menor proporção por glucuronoxilomanogalactana (GXMGal) e de manoproteínas. Pesquisas comprovam que a GXM interage com as células dos hospedeiros, e acredita-se que esse polímero induz a liberação de L-selectina e a expressão de C5aR em neutrófilos, já a GXMGal induz a expressão de Fas-L e apoptose em macrófagos peritoneais murinos, sendo eficiente na indução de óxido nítrico (NO) e secreção de TNF- α . Esses polissacarídeos são liberados no ambiente do hospedeiro e modulam a resposta imune, o que garante sua sobrevivência, com a ausência dessa cápsula resultando em avirulência (BOODWA-KO, DOERING, 2024; ROCHA et al., 2015).

2.3 Clínica da criptococose

As principais manifestações clínicas da criptococose ocorrem devido a infecções no trato respiratório inferior, que na maioria dos casos são autolimitadas, além de infecção no sistema nervoso central (SNC) que tende a evoluir para meningite criptocócica e criptococomas cerebrais, resultando em altas taxas de morbidade neurológica (PERFECT et al., 2010; NEGRONI, 2012; GUSHIKEN, SAHARIA, BADDLEY, 2021).

Em muitos casos, os sintomas são inespecíficos e subagudos, desenvolvendo-se ao longo de um período prolongado e assemelhando-se a sintomas de outras meningites, incluindo dores de cabeça, febre, náuseas, vômitos, mal-estar, alteração do estado mental e aumento da pressão intracraniana. Este último é um dos principais focos no manejo clínico, exigindo terapia antifúngica prolongada (GUSHIKEN, SAHARIA, BADDLEY, 2021; PERFECT et al., 2010).

Na evolução da criptococose pulmonar, assim como na neurocriptococose, observa-se manifestações clínicas variadas e sintomas inespecíficos, como febre, tosse, dispneia, suores noturnos, mal-estar, dor torácica menos frequentemente, hemoptise. Isso devido as variações de contaminação, que vão desde uma colonização assintomática das vias aéreas até nódulos pulmonares, com presença de massas pulmonares isoladas, indo de um simples nódulo a grandes massas cavitárias, múltiplos nódulos ou infecção intersticial disseminada generalizada, além de pneumonia de rápida progressão com síndrome do desconforto respiratório agudo (GUSHIKEN, SAHARIA, BADDLEY, 2021; HOWARD-JONES et al., 2022).

Esses diferentes sítios de infecção podem ocorrer de forma combinada resultando em criptococose disseminada. Atingindo até mesmo o sistema esquelético, que apesar de ser uma manifestação incomum, ocorre em 10% dos pacientes com criptococose disseminada (TSAI, YANG, 2024). Vale lembrar que o primeiro caso publicado de criptococose descrevia uma osteomielite tibial (GUSHIKEN, SAHARIA, BADDLEY, 2021).

2.4 Terapêutica

Em pacientes imunocomprometidos pelo HIV, a escolha do tratamento leva em consideração três pontos críticos, o primeiro é a terapia antifúngica, seguido do gerenciamento da pressão intracraniana para meningite criptocócica e a terapia antirretroviral para restaurar a função imunológica (SRICHATRAPIMUK; SUNGKANUPARPH, 2016).

O *Cryptococcus* é suscetível a polienos, flucitosina e aos azóis. E para a escolha do tratamento leva-se em consideração a extensão da contaminação. Apesar do *C. gattii* parecer ser menos sensível à terapia antifúngica do que o *C. neoformans*, e existam pequenas distinções na prática clínica entre as espécies, os protocolos terapêuticos são os mesmos, no qual a monoterapia com fluconazol é recomendada para doença pulmonar leve a moderada, e em casos graves uma terapia de indução a base de anfotericina B e uma droga de consolidação e manutenção (FANG; FA; LIAO, 2015; SRICHATRAPIMUK; SUNGKANUPARPH, 2016).

Nos casos em que não há evidência de criptococose disseminada, o tratamento para a criptococose pulmonar é o mesmo utilizado para infecções do SNC, para casos moderados, administra-se fluconazol de 400 a 800 mg por dia, durante um período de 6 a 12 meses. Em infecções cutâneas, utiliza-se 400 mg diários por 3 a 6 meses, e para meningite criptocócica e casos de criptococose disseminada ou do SNC, recomenda-se uma dose única de 10 mg/kg de anfotericina B lipossomal, seguida por duas semanas de flucitosina (25 mg/kg, quatro vezes ao dia) e fluconazol (1200 mg diariamente) por 2 a 6 semanas (CHANG et al., 2024; PERFECT et al., 2010; CHEN et al., 2013).

2.5 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico da criptococose disseminada envolve culturas positivas de no mínimo dois locais distintos ou hemoculturas positivas, com características clínicas que podem incluir inchaço e sensibilidade dos tecidos moles, com uma duração média de três meses antes do aparecimento da sintomatologia (TSAI, YANG, 2024).

Na atualidade, existem diversas técnicas que facilitam o diagnóstico laboratorial da criptococose, desde a pesquisa direta do fungo por microscopia até o imunoensaio enzimático, e a detecção de antígeno criptocócico (CrAg) em fluidos corporais, utilizando métodos como aglutinação em látex (LA) (GUSHIKEN, SAHARIA, BADDLEY, 2021; LINDSLEY et al., 2011; SHI et al., 2024). O exame microscópico visa identificar a levedura capsular polissacarídica no líquido cefalorraquidiano (LCR), caracterizada por seu formato esférico, no qual é isolada através de culturas em ágar Sabouraud dextrose (SABITU et al., 2019; FRANZOT et al., 1997).

Os testes de CrAg, incluindo aglutinação em látex (LA), ensaio de fluxo lateral (LFA), teste de antígeno glucuronoxilomanano (GXM) e ensaios imunoenzimáticos (ELISAs), são métodos diagnósticos essenciais para a criptococose (SHI et al., 2024). O teste de aglutinação possui mais de 90% de sensibilidade e especificidade para a criptococose, mas pode ser menos sensível para o diagnóstico do *C. gattii*. O ensaio de fluxo lateral apresenta a maior sensibilidade para o polissacarídeo dos sorotipos criptocócicos, podendo, entretanto, gerar falsos positivos e falsos negativos (efeito prozona) em pacientes com alta carga criptocócica (GUSHIKEN, SAHARIA, BADDLEY, 2021).

Os testes de antígeno criptocócico não diferenciam *C. neoformans* de *C. gattii* (GUSHIKEN, SAHARIA, BADDLEY, 2021). Contudo, há uma técnica simples para distinguir as duas espécies, desenvolvida em 1978, que utiliza cultura em ágar creatinina-dextrose com azul de bromotimol (CDB). Nessa cultura, o *C. neoformans* var. *gattii* torna o meio azul, enquanto o *C. neoformans* var. *neoformans* não altera a cor do meio (KWON-CHUNG, POLACHECK, BENNETT, 1982). Novas metodologias para o diagnóstico da criptococose continuam a surgir, incluindo o NGS (sequenciamento de nova geração), uma técnica promissora com capacidade de em teoria detectar todos os patógenos conhecidos (SHI et al., 2024).

2.5 A biodiversidade como potencial para a descoberta de novos antimicrobianos

Ao longo da história, a natureza tem sido uma fonte de cura para a humanidade, e o reino vegetal possui a capacidade de produzir compostos complexos, desenvolvidos ao longo de milhares de anos de evolução biológica. Em sua maioria, esses compostos são metabólitos secundários que evoluíram dentro de um ambiente bioquímico diversificado (DESMARCHELIER, 2010; T RAMESHA et al., 2011).

Apesar do seu uso ao longo da evolução humana, somente no início do século XIX os primeiros metabolitos de produtos naturais derivados de plantas foram isolados. O farmacêutico Friedrich Wilhelm Adam em 1847 isolou a morfina, droga extraída do *Papaver somniferum*, e em dois anos esse metabolito foi disponibilizado no mercado farmacêutico pela Merck (1826) como um analgésico (SILVA et al., 2022).

Muitas outras drogas derivadas de produtos naturais foram revolucionárias, como o antibiótico penicilina (descoberta em 1928 por Alexander Fleming) derivado do *Penicillium* sp., o ácido salicílico do *Salix* sp. e o agente anticâncer taxol do *Taxus brevifolia* (T RAMESHA et al., 2011). Após a penicilina diversas descobertas de antibióticos aconteceram entre os anos de 1940 e 1960, através de triagens de produtos naturais microbianos (SCARPARO; DOS SANTOS, 2021).

No século XX Tu Youyou, uma pesquisadora Chinesa descobriu que o extrato de éter de *Artemisia annua* L., de nome popular Qinghao, mostrou inibição da malária em roedores. Desses extratos isolou-se um composto e caracterizaram um novo produto natural, levando à descoberta da artemisinina, que foi aprovada como um medicamento antimalárico em 1986, pesquisa que renderia mais tarde o prêmio Nobel de medicina e fisiologia para Tu Youyou (SILVA et al., 2022).

Nas américas, diversas substâncias de interesse farmacológico derivaram de espécies vegetais, com destaque para a quinina, que foi isolada por Pelletier e Caventou (1820) ao estudarem cascas secas de espécies de *Cinchona*, planta essa utilizada pelos indígenas para tratar diferentes tipos de febres, a quinina foi extensamente utilizada para tratar a malária (SILVA et al., 2022).

O Sul da América possui cerca de um terço de toda a diversidade botânica mundial, e o Brasil, detentor da maior biodiversidade do planeta, com aproximadamente 20% das espécies 21 conhecidas, representa uma fonte potencial para a descoberta de novos fármacos. Essa biodiversidade brasileira é, portanto, considerada uma vasta "farmácia ao ar livre" (CALIXTO, 2003).

No Brasil a exploração de produtos naturais deu-se desde início da colonização pelos portugueses, com a exploração do *pau-brasil* (*Caesalpinia echinata*). No ano de 1847 Theodore Peckolt um farmacêutico alemão foi o pioneiro no estudo sistemático de plantas medicinais brasileiras (SILVA et al., 2022). O território brasileiro possui um dos maiores recursos genéticos do mundo quando se trata de espécies vegetais com potencial terapêutico, com estudos baseados nessa diversidade promissores para o desenvolvimento do antimicrobianos (SCARPARO; DOS SANTOS, 2021).

Os antibióticos classificados como naturais possuem estruturas químicas complexas, e a busca por essas moléculas vem sendo exploradas em diferentes habitats, e as plantas vem contribuindo significativamente para tais pesquisas (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Diversas espécies pertencentes ao bioma brasileiro já demonstram capacidade antimicrobiana, no cerrado por exemplo temos a *Copaifera langsdorffii*, *Roupala montana* e a *Stryphnodendron rotundifolium* (RIBEIRO et al., 2014).

2.6 *Hymenaea courbaril* L.

O gênero *Hymenaea* abrange aproximadamente 16 espécies, que estão distribuídas pelas Américas e oeste da Índia, ocorrendo somente uma espécie no leste da África. No Brasil, *Hymenaea courbaril* L., é popularmente conhecida como jatobá, e apresenta uma ampla distribuição, sendo encontrado desde a floresta amazônica até a floresta estacional semidecidual no sudeste do país (BONIFACE; FERREIRA; KAISER, 2017; TIAGO et al., 2020).

O jatobá possui relevância econômica significativa. Sua madeira é amplamente utilizada nas indústrias moveleira, construção civil e naval, devido à sua durabilidade e resistência. A polpa dos frutos é consumida na alimentação humana e animal, destacando-se pelo alto valor nutritivo (TIAGO et al., 2020). Morfologicamente, o jatobá é uma árvore de grande porte, com folhas compostas por dois folíolos, inflorescências em panículas terminais e frutos em forma de vagens indeiscentes, com sementes envoltas por uma polpa farinácea (DUARTE et al., 2016).

Os povos indígenas, utilizam diferentes partes dessa planta para o tratamento de várias doenças desde disenteria, cólica intestinal, fraqueza pulmonar, asma, anemia, dor de garganta, problemas renais, além de doenças virais. Do ponto de vista fitoquímico, a *H. courbaril* já demonstrou potencial para inibir fungos dermatófitos e espécies do complexo *C. neoformans* (DA COSTA, 2014), além de apresentar atividade antimicrobiana contra outros microrganismos, incluindo bactérias multirresistentes, os óleos essenciais extraídos dos frutos mostraram forte atividade larvicida contra *Aedes aegypti*, vetor de doenças como dengue, chikungunya e zika (BONIFACE; FERREIRA; KAISER, 2017; EVERTON et al., 2021; ALEIXO et al., 2015; TIAGO et al., 2020).

2.7 *Astronium urundeuva* (M.Allemão) Engl.

O gênero *Astronium*, pertencente à família Anacardiaceae, e compreende diversas espécies arbóreas nativas da América do Sul, destacando-se a *Astronium urundeuva* (M.

Allemão) Engl., conhecida popularmente como aroeira-do-sertão ou aroeira-preta. Esta espécie possui ampla distribuição em ambientes áridos e é frequentemente utilizada na medicina tradicional devido às suas propriedades terapêuticas (BONIFÁCIO et al., 2019).

A *Astronium urundeuva*, possui atividade antifúngica contra *Candida albicans* e *C. glabrata*, além de ação antimicrobiana significativa contra bactérias Gram-negativas (BONIFÁCIO et al., 2019; LIMA, 2023; BONIFÁCIO et al., 2024). Em um estudo com diversos extratos vegetais demonstrou que o extrato de *Astronium urundeuva* possui um grau de atividade fungicida contra o *C. neoformans* (SILVA et al., 2020).

Possuindo ainda propriedades: antiinflamatória, analgésica, cicatrizante, antidiabética, antineoplásica e contra doenças associadas ao aparelho digestivo, respiratório e sistemas geniturinários. Isso deve-se a presença de muitos metabólitos secundários, como polifenóis, flavonóides, taninos, terpenóides e chalconas, que podem ser responsáveis por suas propriedades biológicas (OLIVEIRA et al., 2023).

2.8 *Cecropia distachya* Huber

O gênero *Cecropia* pertence à família Urticaceae é amplamente reconhecido por sua ocorrência em regiões tropicais das Américas, desempenhando um papel significativo nos ecossistemas onde está presente. As espécies desse gênero são frequentemente associadas a ambientes de floresta secundária e áreas perturbadas, onde atuam como pioneiras devido ao seu rápido crescimento e adaptações ecológicas (AL SHAMMARI, 2024).

Ainda há poucos estudos sobre a capacidade antifúngica de espécies do gênero *Cecropia*. Contudo, sabe-se que algumas espécies contêm substâncias como triterpenos, terpenoides, lactonas sesquiterpênicas, flavonoides, fenóis e glicosídeos flavonoides, compostos com potenciais ações antimicrobianas, citotóxicas e antitumorais (ORTÍZ-ARDILA et al., 2017; ALVES et al., 2019).

Estudos recentes destacam o potencial desse gênero no campo farmacológico e na restauração ecológica. A investigação de seus metabólitos secundários revela a presença de compostos fenólicos, particularmente ácidos fenólicos, flavonoides, taninos condensados, triterpenoides, flavonolignanos e iridoides, mas há relatos da presença de aproximadamente 100 compostos, com alguns desses já isolados como o ácido yarúmico (*C. telenitida*), ácido isoyarumico (*C. telenitida*), ent-mururin A (*C. obtusifolia*) e ent-mururin B (*C. obtusifolia*) (RIVERA-MONDRAGÓN et al., 2021).

3. METODOLOGIA

3.1 Tipo de pesquisa

Esse estudo foi do tipo experimental, transversal e de abordagem quantitativa. O estudo experimental segue um planejamento rigoroso, no qual as etapas de pesquisa iniciam-se pela formulação exata do problema e das hipóteses, que delimitam as variáveis precisas e controladas que atuam no fenômeno estudado (BARAGATTI et al., 2020).

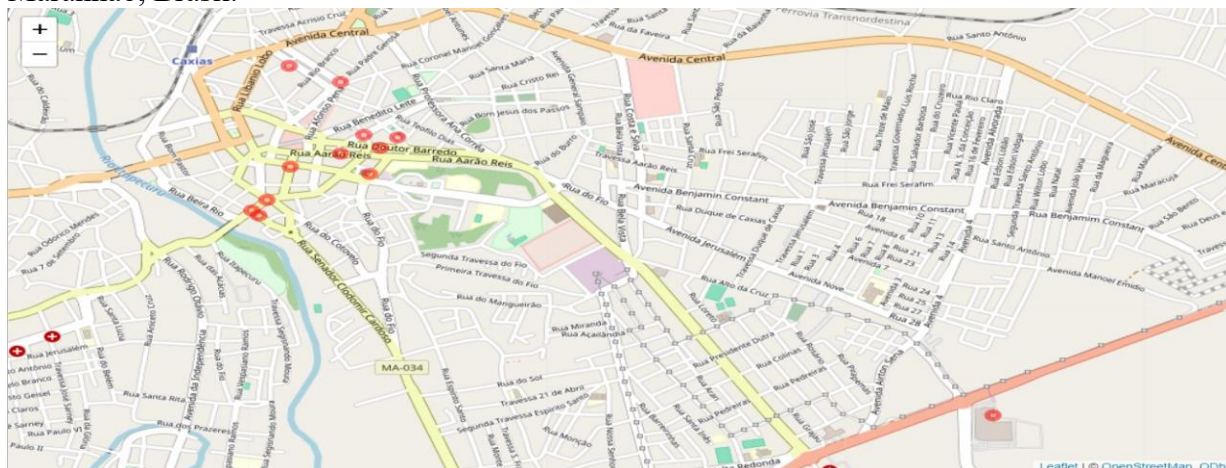
Martins et al (2014), define a pesquisa transversal como o estudo analítico observacional que produz um retrato instantâneo da situação, num determinado momento, ou seja, o fator e o efeito são observados no mesmo momento. E diferentemente da pesquisa qualitativa, os resultados da pesquisa quantitativa podem ser quantificados, ela recorre à linguagem matemática para descrever as causas de um fenômeno, as relações entre variáveis, etc.

3.2 Local de estudo

A coleta de dados foi realizada no Centro do município de Caxias, Maranhão, Brasil. No qual observou-se a presença de bandos de *C. livia*.

Este município possui uma área territorial de 5.201,927 km², apresentando uma população estimada em 156.970 habitantes em 2022 e uma densidade demográfica de 30,18 habitantes/km², banhado pelo rio Itapecuru e com clima tropical, situa-se na região leste do estado do Maranhão, a 374 km da capital maranhense, São Luís, e 70 km da capital piauiense, Teresina (IBGE, 2023).

Figura 2. Localização com pontos de coletas de fezes de *C. livia* no município de Caxias, Maranhão, Brasil.



Fonte: Elaboração própria, 2024.

Os locais de coleta foram definidos com base no fluxo relevante de pessoas e maior concentração de bandos do *C. livia* próximo a Hospitais, Escolas e Universidades. No qual coletou-se 36 amostras em 12 pontos (**Figura 2**) diferentes no período de Maio a Julho de 2024.

O tratamento das amostras e a realização dos métodos de análise ocorreram nas dependências do Laboratório de Microbiologia e Imunologia de Doenças Infectoparasitárias (LAMIDI), da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), que conta em sua infraestrutura com equipamentos laboratoriais necessário para pesquisas microbiológicas.

3.3 População de estudo

A população do estudo foi composta somente por fezes de *Columba livia*, coletadas em ambientes urbanos no município de Caxias maranhão, onde existiam maior concentração de *C. livia*.

Os extratos utilizados neste trabalho foram a base das seguintes espécies vegetais: *Hymenaea courbaril* L., *Astronium urundeuva* (M.Allemão) Engl., e *Cecropia distachya* Huber.

Para o preparo dos extratos vegetais foram aproveitados a casca do tronco da *H. courbaril*, casca do tronco da *A. urundeuva*, e as folhas da *C. distachya*. Sendo utilizado somente as folhas e cascas das plantas que se mostraram integras, sem quaisquer sinais de decomposição ou de danos. As plantas foram coletadas nas regiões do município de Caxias, Maranhão.

3.4 Isolamento e identificação fúngica

As amostras foram coletadas com o auxílio de espátulas e luvas, sendo somente fezes envelhecidas e secas provenientes do *C. livia*, no qual foram acondicionadas em potes de plásticos estéreis, com tampa de boca larga e com rosca, devidamente identificados, com data e local das coletas, e levadas até o Laboratório de Microbiologia e Imunologia de Doenças Infectoparasitárias (LAMIDI), da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), onde permaneceram armazenadas em temperatura ambiente por 48 horas.

Após esse período as amostras foram homogeneizadas em gral com pistilo de porcelana previamente esterilizados, e transferidas para tubos de ensaios para a realização da suspensão de aproximadamente de 1g de fezes para 10mL de solução salina (0.9%) e agitadas

em vórtex por três minutos, deixando repousar por 30 minutos à temperatura ambiente, metodologia adaptada de Malekifard; Ghaniei; Eidi (2023).

Todas as amostras tiveram o sobrenadante semeado por esgotamento, com auxílio de alças bacteriológicas de 10µl, em duas placas de Petri, cada uma contendo meio de cultura Ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e incubadas a 30°C por um período de 7 dias, conforme a metodologia original proposta por Franzot et al., (1998).

3.5 Identificação do *C. neoformans*

A identificação do *C. neoformans* foi realizada através das características das colônias, de coloração marrons/amareladas e de aspecto viscosa em ágar, além de testes bioquímicos, que foram realizados através do crescimento dos isolados em azul de bromotimol de creatinina dextrose em meio de timina seguindo a metodologia de Franzot et al., (1997).

Após a identificação, as colônias foram repicadas no meio de cultura Ureia-ágar-base, com o objetivo de identificar o gênero *Cryptococcus* (FU et al., 2018). Após os repiques os isolados foram incubados a 30°C por cinco dias. e após seu crescimento para a diferenciação das espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, utilizou-se o meio canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB), seguindo a metodologia original de Kwon-Chung, Polacheck, Bennett (1982).

3.6 Avaliação da sensibilidade fúngica

3.6.1 Extratos vegetais brutos

Os testes de sensibilidade frente a extratos vegetais foram realizados por meio da técnica da difusão em ágar Mueller-Hinton, na qual em uma placa padrão de 90 mm, realizou-se o plaqueamento com ágar-ágar, e após a solidificação, inoculou-se diretamente no ágar Mueller-Hinton com uma alça bacteriológica uma massa celular de *C. neoformans*, e agitou-se em vórtex para que fosse depositado na superfície da placa. Então, após a solidificação um furo de diâmetro de 6mm aproximadamente foi realizado, de maneira asséptica com uma ponta estéril, e um volume 20 µL da solução do extrato foi introduzido no poço (BALOUIRI, SADIKI, IBNSOUDA, 2016; GURUNG et al., 2024).

3.6.2 Drogas sintéticas

Enquanto os testes com antifúngicos foram realizados através da técnica de difusão em disco em ágar Mueller-Hinton, suplementado com 2% glicose e 0,5 g/mL de azul de metileno seguindo diretrizes do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI M44), no qual utilizou-se discos impregnados com fluconazol (25 mcg), itraconazol (10 mcg), ketoconazol (50mcg), e anfotericina B (100 mcg) (Cecon-Sensifungidisc, São Paulo, Brasil). Com os seguintes valores de corte da **Tabela 1**:

Tabela 1: Valores de corte para fluconazol, itraconazol, ketoconazol, e anfotericina B, baseando-se como controle as espécie de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6528 .

Antifúngico	S	I	R
Anfotericina B	> 10 mm	Não aplicável	≤ 10 mm
Itraconazol	≥ 20 mm	12–19 mm	≤ 11 mm
Fluconazol	≥ 19 mm	14–18 mm	≤ 13 mm
Ketoconazol	≥ 28 mm	21–27 mm	≤ 20 mm

Fonte: CLSI (M44), 2018.

S = Suscetível; **I** = Intermediário; **R** = Resistente.

3.7 Extratos vegetais

Os extratos utilizados nesta pesquisa foram do tipo extrato bruto, que foram definidos com base em indícios na literatura de atividade antimicrobiana, sendo definido portanto, os seguintes órgãos para obtenção dos extratos: casca do tronco *Hymenaea courbaril* L., casca do tronco da *Astronium urundeuva* (M.Allemão) Engl., e as folhas da *Cecropia distachya* Huber.

Os extratos foram obtidos seguindo as recomendações da Farmacopeia Brasileira (2019). Onde após a coleta, os órgãos foram postos para secagem à sombra, em ambiente arejado durante um período de 7 dias. A trituração dos mesmos foi realizada em moinho de facas até a condição de pó, em sequência, adicionado ao pó solvente metanol, que permaneceu em repouso por 21 dias sob condição de agitação diária. Após esse período, o material foi filtrado e depositado em um evaporador rotativo a 40°C entre 70-80 rpm para retirada de todo o solvente.

A identificação das espécies dos vegetais foi realizada pela botânica Dra. Laice Fernanda Gomes de Lima e o botânico Guilherme Sousa da Silva, e depositadas no herbário Professor Aluizio Bittencourt – HABIT, com número de tombo 5067, e 5066 respectivamente.

3.8 Análise estatística

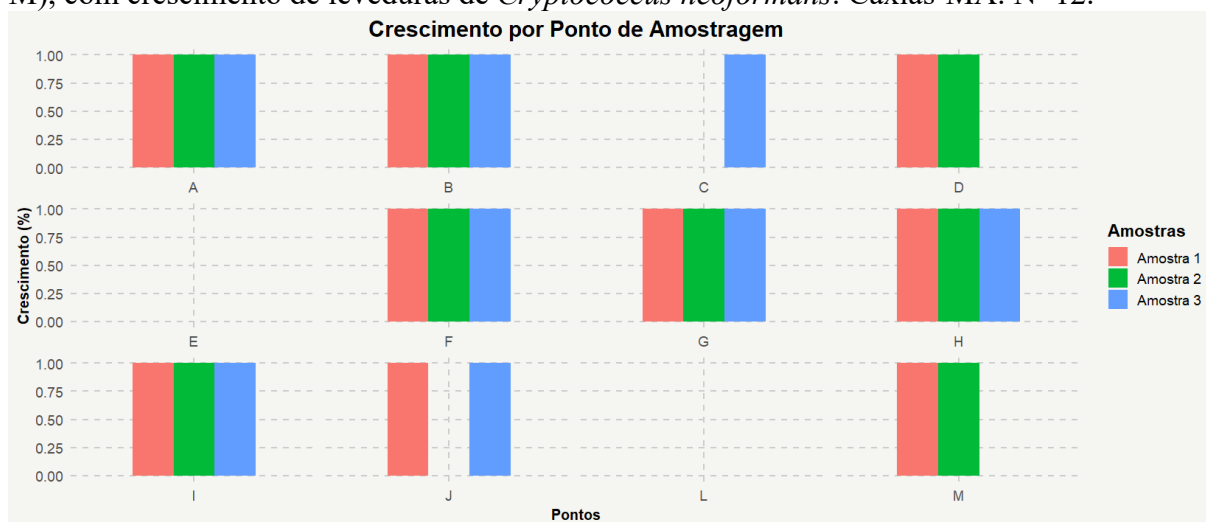
Todos os dados foram analisados usando o programa RStudio (R version 4.4.2). utilizando três testes comparativos – ANOVA, Teste de Tukey, e Teste de Homogeneidade. Os valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento e identificação fúngica

Após o semeio do material biológico, das 36 amostras 25 (69,44%) apresentaram crescimento de colônias do fungo como descrito na **Figura 3**, e após a análise microscópica observou-se a presença de leveduras encapsuladas. É descrito na literatura que altas temperaturas podem diminuir a possibilidade de o *Cryptococcus* sobreviver no meio ambiente (ARAÚJO JUNIOR et al., 2015), porém, mesmo as coletas sendo realizadas em um período de Maio a Julho de 2024, no qual a temperatura mante-se elevada (SILVA et al., 2016), não foi impedimento para o crescimento fúngico, obtendo-se colônias puras e exuberantes como demonstrado na **Figura 4**.

Figura 3. Gráfico representativo dos 12 pontos de coletas feitas de *C. livia* (nomeados de A-M), com crescimento de leveduras de *Cryptococcus neoformans*. Caxias-MA. N=12.



Fonte: Autoria própria, 2024.

Figura 4. Crescimento de colônias de cepas de *Cryptococcus neoformans* em ágar sabourad dextrose. Caxias-MA, 2024.



Fonte: Autoria própria, 2024.

A presença significativa de *Cryptococcus* em ambientes de grande circulação de seres humanos é um problema de ordem sanitária e saúde pública pois favorece a infecção por essas cepas, visto que o *C. neoformans* possui capacidade de disseminar-se tanto em pacientes imunocomprometidos como em hospedeiros aparentemente imunocopetentes (MAZIARZ; PERFECT, 2016), o contatado com o microrganismo ocorre através da inalação de esporos de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* na forma de levedura ou basidiósporos, de origem ambiental (ZAVALA, BADDLEY, 2020; LIU, 2016).

Após o contato o patógeno infecta o indivíduo, infecção essas que geralmente desencadeia quadros de criptococose pulmonar (HOWARD-JONES et al., 2022; SETIANINGRUM, RAUTEMAA-RICHARDSON, DENNING, 2019; HSIAO et al., 2022). Por possuir predileção pelo sistema nervoso central (SNC), podendo ocasionar ainda o desenvolvimento de meningoencefalite, uma condição potencialmente fatal, de alta morbidade e alta mortalidade, ou a ocorrência de infecções combinadas entre o SNC e pulmonar, e possibilidade do desenvolvimento de uma forma sistêmica (HOWARD-JONES et al., 2022; CHANG et al., 2024).

Pesquisadores brasileiros analisaram excrementos de *C. livia*, mas, o *C. neoformans* não foi detectado nas amostras, porém, ainda sim ressaltaram que as cepas de *Cryptococcus* podem sobreviverem no ambiente por cerca de até 2 anos sendo necessário o alerta para as autoridades sanitárias, visto a presença de fezes de *C. livia* no meio ambiente (ROSA et al., 2016). Em antagonismo, e corroborando com os achados nesta pesquisa, Pinheiro et al. (2020), conseguiram isolar o *C. neoformans* das fezes de *C. livia*, além de outros tipos de

fungos como *Candida* spp. e *Rhodotorula* spp.. Demonstrando assim que o *C. livia* é um grande disseminador de patógenos. Com o isolamento dessa levedura, em fezes de *C. livia* sendo descrito em várias outras regiões do mundo (FUNES et al., 2022; ELLABIB et al., 2016; MIRPOURIAN et al., 2021; GONZÁLEZ-HEIN, GONZÁLEZ-HEIN, JARABRÁN, 2010).

4.2 Resultados da Análise Estatística

Os resultados da análise estatística demonstraram diferenças significativas entre os tratamentos avaliados. A análise de variância (ANOVA) apresentou um valor F de 26,42, indicando forte evidência de diferenças entre os grupos. Com um grau de liberdade para os tratamentos (Df=3f) e um valor de probabilidade extremamente significativo ($p=1,38 \times 10^9$), conclui-se que as médias dos tratamentos são estatisticamente diferentes.

Para aprofundar essa análise, o teste de Tukey foi realizado, permitindo a comparação entre pares de tratamentos. Os resultados mostraram que o extrato C é significativamente diferente do extrato A ($p=0,0000005$) e do extrato B ($p=0,0000002$). O fluconazol também apresentou diferenças significativas em relação ao extrato A ($p=0,0000078$) e ao extrato B ($p=0,0000030$). Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas entre o extrato A e o extrato B ($p=0,9904$), nem entre o fluconazol e o extrato C ($p=0,8220$).

Além disso, o teste de homogeneidade de variâncias de Levene foi aplicado para verificar a adequação dos pressupostos do modelo. O resultado ($p=0,8324$) confirmou que as variâncias dos grupos são homogêneas, o que valida o uso da ANOVA para esta análise.

4.3 Avaliação da sensibilidade fúngica – extratos vegetais brutos

Os testes de suscetibilidade das cepas de *C. neoformans* frente aos extratos vegetais brutos demonstraram sensibilidade variável como observado no **Quadro 1**.

QUADRO 1. Perfis de suscetibilidade de isolados de *C. neoformans* em relação aos extratos vegetais brutos utilizados na pesquisa. Caxias-MA, 2024. N=13.

Amostra	Extrato A	Extrato B	Extrato C	Fluconazol
A	26,66 mm	21,33 mm	R	R
B	24 mm	35,33 mm	R	R
C	27,33 mm	30,66 mm	R	R

D	32 mm	31,33 mm	12,5 mm	R
E	SC	SC	SC	SC
F	25,33 mm	28 mm	R	R
G	20 mm	24,66 mm	R	R
H	40 mm	37,33 mm	20 mm	42 mm
I	31,33 mm	32 mm	R	R
J	29,33 mm	30,66 mm	R	11 mm
L	SC	SC	SC	SC
M	29,33 mm	29,33 mm	R	R
<i>C. neoformans</i> (ATCC 32045)	15,33 mm	12,33 mm	R	15 mm

Fonte: Autoria própria, 2024.

SC= Sem crescimento; **MM** = milímetro; **R=** resistente; **Extrato A=** *H. courbaril*; **Extrato B=** *A. urundeuva*; **Extrato C=** *C. distachya*; **ATCC** = American Type Culture Collection.

O extrato bruto de *H. courbaril* apresentou inibição significativa em todas as cepas analisadas no estudo. algumas espécies do gênero *Hymenaea* spp. em especial a *H. courbaril*, que possui grande potencial para pesquisas que visam o isolamento de substâncias de interesse médico, no qual sua seiva já foi descrita com capacidade de inibir o crescimento de fungos dermatófitos e do complexo de espécies *C. neoformans* (DA COSTA et al., 2014). Possuindo ainda atividade antimicrobiana a outros microrganismos, inclusive contra bactérias multirresistentes (EVERTON et al., 2021; ALEIXO et al., 2015).

O extrato de *A. urundeuva*, também apresentou capacidade inibitória das cepas de *C. neoformans*. Espécie essa cuja a atividade antifúngica já foi demonstrada contra *Candida albicans* e *C. glabrata* (BONIFÁCIO et al., 2019; BONIFÁCIO et al., 2024), e ainda possuindo ação antimicrobiana significativa contra bactérias Gram-negativas (LIMA et al., 2023). Um estudo realizado com diversos extratos, determinou que o *C. neoformans* (cepa ATCC) possui certo nível de sensibilidade a extratos de *A. urundeuva* o que demonstra o potencial dessa espécie vegetal (SILVA et al., 2020).

Com relação ao extrato bruto de *C. distachya* observou-se resistência em 80% das cepas de *C. neoformans* com atividade inibitória somente em 10% das cepas. Não existem muitos estudo sobre a capacidade antifúngica com espécies do gênero *Cecropia*, porém, sabe-se que algumas apresentam substâncias como triterpenos, terpenóides, lactonas sesquiterpênicas, flavonóides, fenóis, e glicosídeos flavonóides, compostos esses com ações

farmacológicas antimicrobianas, citotóxicas e antitumoral (ORTÍZ-ARDILA et al., 2017; ALVES et al., 2019).

Apesar da não atividade observada neste trabalho, existem estudos que através de técnicas semelhantes demonstraram uma atividade considerável de espécies de *Cecropia*, em especial a *C. pachystachya* frente a fungos e bactérias patogênicas como *Staphylococcus aureus*, *S. pyogenes* e *C. albicans* (DE ANDRADE et al., 2021).

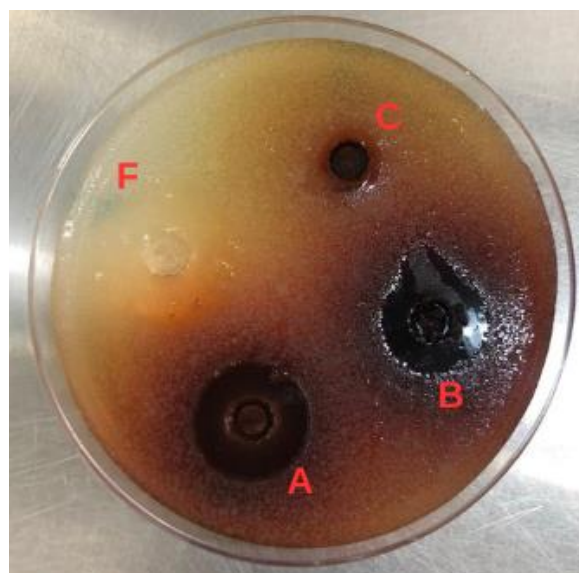
Com base nos resultados obtidos no **Quadro 1**, os extratos brutos A e B inibiram o crescimento de forma significativa das cepas ambientais de *C. neoformans*. Assim, essas espécies vegetais podem ser uma opção na busca de novas drogas para o tratamento da criptococose. Tendo em vista o surgimento de resistência aos antifúngicos, novas estratégias fazem-se necessárias para vencer essa barreira, e a biodiversidade existente no Brasil é uma fonte potencial para a descobertas desses novos fármacos, sendo considerada a maior do mundo, detentora de aproximadamente 20% das espécies do globo, e ainda nos dias atuais no qual a grande parte dos medicamentos são de origem sintéticas, mais de 40% do medicamentos disponíveis na industrial farmacêutica, e 70% dos antibióticos e anticancerígenos são oriundos da natureza (CALIXTO, 2003; JOLY, QUEIROZ, 2020).

Isso ganha força quando algumas substâncias isoladas derivadas de metabólitos secundários dessas espécies vegetais têm seu potencial antimicrobiano demonstrado, como os da *H. courbaril* demonstrando capacidade antimicrobiana significativa em testes em vitro, tendo a Fisetina seu principal metabólito secundário (flavonoide), a Taxifolina (Flavonoide) e o Epatulenol (Sesquiterpeno) (DA COSTA et al., 2014; DA CRUZ, et al., 2023). E da *Astronium urundeuva* destacando-se como metabólitos secundários a Urundeuquina A, B, C e a matosina que são chalconas diméricas (MACHADO, A. C.; OLIVEIRA, 2014).

Figura 5. Demonstrativo dos halos de suscetibilidade de cepas de *C. neoformans* em relação aos extratos brutos dos vegetais. Caxias-MA, 2024.

Fonte: Autoria própria, 2024.

A = Extrato A (*H. courbaril*); **B**= Extrato B (*A. urundeuva*); **C**= Extrato (*C. distachya*) **F** = Fluconazol.



O fluconazol foi utilizado como controle positivo, porém, apresentou uma alta taxa de resistência (90%), possuindo uma atividade inibitória significativa somente em 10% das cepas de *C. neoformans*. dos 2 isolados de *C. neoformans* (**Quadro 1**).

4.4 Avaliação da sensibilidade fúngica – antifúngicos

Quanto aos testes de suscetibilidade realizados pelo método de Kirb-Bauer, com as cepas de *C. neoformans* frente aos antifúngicos (Anfotericina B, Fluconazol, Itraconazol e Ketoconazol) comumente utilizados no tratamento de infecções por essa levedura, os resultados demonstraram que algumas cepas foram resistentes à parte dos antifúngicos, corroborando com a resistência observada ao fluconazol no primeiro teste (**Quadro 1**).

QUADRO 2. Perfis de suscetibilidade de cepas *C. neoformans* ambientais frente aos antifúngicos Anfotericina B, Fluconazol, Itraconazol e Ketoconazol. Caxias-MA, 2024. N=12.

Amostra	Anfotericina b	Fluconazol	Intraconazol	Ketoconazol
A	S (20 mm)	R	R	R
B	R	R	R	R
C	R	R	R	R
D	R	R	R	R
E	SC	SC	SC	SC
F	R	R	R	R
G	R	R	R	R
H	S (20 mm)	S (18 mm)	R	R
I	R	R	R	R
J	S (28 mm)	S (28 mm)	S (18 mm)	S (20 mm)
L	SC	SC	SC	SC
M	S (22 mm)	R	R	R

Fonte: Autoria própria, 2024.

Legenda: SC = sem crescimento microbiano; MM = milímetro; R= resistente (não houve desenvolvimento do halo de inibição), S = sensível (houve desenvolvimento do halo de inibição) em mm, incluindo o próprio disco de 6 mm.

A presença dessas cepas resistentes no meio ambiente além de proporcionar uma maior probabilidade de contato com seres humanos, preocupa, estes resultados ganham robustez pois, os relatos de resistência as drogas azólicas representam uma crescente (VENA et al., 2019), corroborando com esses resultados, uma pesquisa utilizando diferentes metodologias em vitro já demonstraram certo nível de resistência a essa classe farmacológica em especial ao fluconazol, com alguns isolados sendo capazes até de adaptarem-se a níveis de fluconazol entre 64 a 256 µg/ml (VARMA, KWON-CHUNG, 2010).

O fluconazol é uma das principais drogas utilizadas no tratamento de infecções ocasionadas pelo *C. neoformans* em seres humanos, entretanto, os resultados demonstraram um dado importante, a resistência de cepas de *C. neoformans* ambientais a esse antifúngico, o que pode ser um dado epidemiológico muito interessante, haja vista, que as pessoas da comunidade estão expostas a esse patógeno, principalmente em logradouros públicos.

Outro dado importante quanto à resistência de cepas de *C. neoformans* ambientais ao fluconazol é o fato do *C. livia* ser encontrado próximo a ambientes hospitalares, o que aumenta a possibilidade de infecção de pessoas em imunossupressão. Um estudo com cepas de isolados clínicos de *Cryptococcus* comparou a resistência do fungo a fluconazol em dois períodos de incubação, no qual observou-se que em um período de incubação de 48 horas o resultado da difusão em disco (Kirby-Bauer) indicou que 27,1% das cepas eram resistentes, e as cepas incubadas durante 72 horas 54,2% eram resistentes (HUANG et al., 2024).

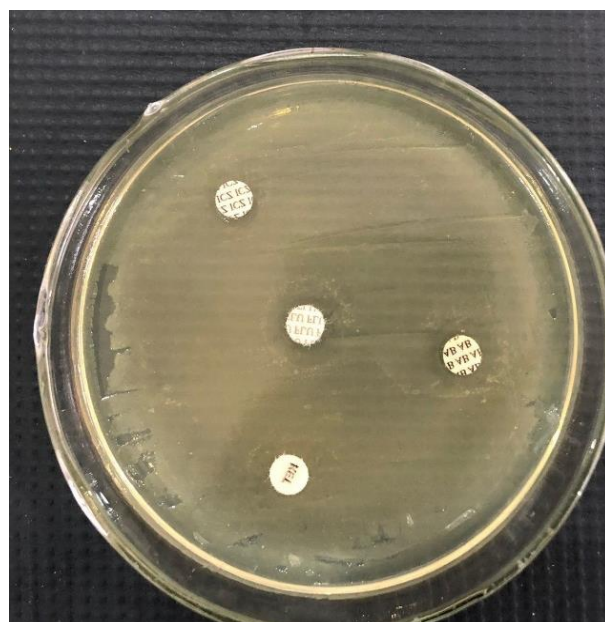
Observou-se no **Quadro 2**, um elevado número de cepas de *C. neoformans* resistentes à anfotericina B e ao itraconazol. Esses dados demonstram que cepas desse fungo, encontradas no meio ambiente apresentando resistência a essas duas drogas em particularmente, pode ser um grave problema em saúde pública na atualidade, levando em consideração, que essas cepas podem infectar pessoas da comunidade e facilmente levar a morte dos infectados dado à resistência aos antifúngicos mais potentes. A resistência a anfotericina B gera grande preocupação, visto que é a droga de primeira escolha para o tratamento da criptococose (JARVIS et al., 2022).

Na terapia da meningite criptocócica a anfotericina B, é em muitas vezes utilizadas em combinação com flucitosina, seguida por uma fase de manutenção com fluconazol para prevenir recaídas (JARVIS et al., 2022; NGAN, FLOWER, DAY, 2022). Em infecções pulmonares e outras formas menos graves, o fluconazol ou itraconazol são frequentemente utilizados. Sendo a profilaxia a longo prazo com fluconazol comum em pacientes com AIDS para prevenir recidivas (HOWARD-JONES et al., 2022; ZAVALA; BADDLEY, 2020).

Não é atual os relatos de resistência de *Cryptococcus* a anfotericina B com estudos já em 1998 demonstrando certo grau de resistência a essa droga (LOZANO-CHIU et al., 1998), confirmando-se ao longo do tempo (HSUEH et al., 2005). O que é alarmante visto que em alguns lugares a terapia associada com anfotericina B e flucitosina não está disponível, sendo o uso isolado da anfotericina B a única opção terapêutica para a criptococose, sabe-se que a associação entre as duas drogas aumenta capacidade de morte fúngica, isso foi relatado em estudo no qual observou-se em vitro que a sinergia entre a Anfotericina B e a 5-flucitosina (SOARES et al., 2008).

Não se sabe por completo como ocorre a resistência do *Cryptococcus* spp, até o momento sabe-se que a hibridização entre *Cryptococcus* spp. influencia o desenvolvimento dessa resistência, alguns trabalhos sugerem que a resistência aos azóis por exemplo está relacionada ao alterações em um gene que codifica a enzima lanosterol 14 α -desmetilase, o gene ERG11 (BERMA; GEDDES-MCALISTER, 2020). Outro ator importante é a melanina presente na cápsula fúngica, que se acredita impedir que as drogas atinjam o local alvo (KHAN et al., 2009).

Figura 6. Teste de suscetibilidade com inibição e sensibilidade de cepas de *C. neoformans* frente aos antifúngicos Anfotericina B, Fluconazol, Itraconazol e Ketoconazol. Técnica de KIrB-Bauer. Caxias-MA, 2024.



Fonte: Autoria própria, 2024.

KZ = Ketoconazol; **AB** = anfotericina B; **ICZ** = itraconazol; **FLU** = fluconazol.

5. CONCLUSÃO

As cepas de *C. neoformans* isoladas das fezes de *C. livia* em ambientes próximos a hospitais e universidades, locais de livre fluxo de pessoas, são riscos de contaminação, devido a capacidade de disseminação do patógeno e do reservatório (O *C. livia*), podendo infectar indivíduos, imunocompetentes e especialmente indivíduos imunossuprimidos.

Os isolados fúngicos foram identificados fenotipicamente por meio de provas bioquímicas e por microscopia, sendo constatado que as cepas eram do tipo *C. neoformans*.

Essas cepas fúngicas apresentaram padrão de resistência e suscetibilidade variados em relação aos extratos vegetais brutos e aos antifúngicos.

Observou-se um elevado número de cepas de *C. neoformans* resistentes à anfotericina B e ao itraconazol.

Dessa forma os resultados dessa pesquisa destacam para a necessidade um monitoramento da disseminação do *Cryptococcus neoformans*, principalmente próximo a

hospitais e universidades. Os padrões variáveis de suscetibilidade aos extratos vegetais, dão robustez a necessidade de buscar na natureza uma solução para a crescente resistência microbiana as terapias convencionais. Portanto esse estudo contribui para a compreensão da epidemiologia do patógeno no município alvo e para o futuro desenvolvimento de alternativas terapêuticas, fazendo-se ainda necessário implementar medidas integradas de vigilância sanitária, prevenção e manejo clínico no contexto da criptococose.

REFERÊNCIAS

1. AGUIAR, J. C. D. Estudo fitoquímico e Biológico de *Hymenaea courbaril* L. 2009. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009. Disponível em: **Repositório Institucional UFC**. Acesso em: 17 jan. 2025.
2. AL SHAMMARI, Latifah. Phytochemical diversity, therapeutic potential, and ecological roles of the *Cecropia* genus. **Heliyon**, 2024.
3. ALEIXO, Alan Alex et al. Synergistic activity from *Hymenaea courbaril* L. and *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville against multidrug-resistant bacteria strains. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, n. 26, p. 741-748, 2015.
4. ALMEIDA, Mariana Barros et al. Descrição morfológica do fruto e semente do jatobá (*Hymenaea courbaril* L.). **Revista Semiárido de Visu**, v. 1, n. 2, p. 107-115, 2011.
5. ÁLVAREZ-BUYLLA, E. et al. **Role of *Cecropia* in tropical forest regeneration**. *Tropical Ecology*, v. 62, n. 3, p. 345-360, 2021.
6. ALVES SOARES, Emmanuel et al. Mortality by cryptococcosis in Brazil from 2000 to 2012: A descriptive epidemiological study. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 7, p. e0007569, 2019.
7. ALVES, Georgia de Assis Dias et al. *Cecropia obtusa* extract and chlorogenic acid exhibit anti aging effect in human fibroblasts and keratinocytes cells exposed to UV radiation. **PLoS One**, v. 14, n. 5, p. e0216501, 2019.
8. ALVES, Gleica Soyan Barbosa et al. Molecular typing of environmental *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complex isolates from Manaus, Amazonas, Brazil. **Mycoses**, v. 59, n. 8, p. 509-515, 2016.
9. ANDRADE-SILVA, Leonardo Euripedes et al. Genotypic analysis of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates from Brazil reveals the presence of VNB isolates and a correlation with biological factors. **PLoS One**, v. 13, n. 3, p. e0193237, 2018.
10. ARAÚJO JUNIOR, Erivelto Corrêa de et al. *Cryptococcus*: isolamento ambiental e caracterização bioquímica. **Arquivo Brasileiro de Medicina veterinária e zootecnia**, v. 67, p. 1003-1008, 2015.
11. BALOUIRI, Mounyr; SADIKI, Moulay; IBNSOUDA, Saad Koraichi. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of pharmaceutical analysis**, v. 6, n. 2, p. 71-79, 2016.
12. BARAGATTI, Waldiemes Paraibuna et al. PROPOSTA DE MELHORIA DE UMA LINHA DE PRODUÇÃO DE VIDROS BLINDADOS ATRAVÉS DO USO DA TECNOLOGIA KINECT. **Revista Campo da História**, v. 5, n. 1, p. 20-37, 2020.
13. BARBOSA JUNIOR, A. M. et al. Estudo comparativo da susceptibilidade de isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice, 1895) frente a alguns antifúngicos de uso

hospitalar e extratos vegetais obtidos de plantas medicinais da região semiárida sergipana. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, p. 120-132, 2015.

14. BASTOS, Rafael W. et al. Fungicide effects on human fungal pathogens: cross-resistance to medical drugs and beyond. **PLoS Pathogens**, v. 17, n. 12, p. e1010073, 2021.
15. BERMAS, Arianne; GEDDES-MCALISTER, Jennifer. Combatting the evolution of antifungal resistance in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular microbiology**, v. 114, n. 5, p. 721-734, 2020.
16. BONIFACE, Pone Kamd em; FERREIRA, Sabrina Baptista; KAISER, Carlos Roland. Current state of knowledge on the traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of the genus *Hymenaea*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 206, p. 193-223, 2017.
17. BONIFÁCIO, Bruna Vidal et al. Anti-Candida sp. activity of *Astronium urundeuva* derivatives free and loaded into a nanostructured lipid system. **Chemical Papers**, v. 78, n. 2, p. 973-979, 2024.
18. BONIFÁCIO, Bruna Vidal et al. Antifungal activity of a hydroethanolic extract from *Astronium urundeuva* leaves against *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2642, 2019.
19. BOODWA-KO, Daphne; DOERING, Tamara L. A quick reCAP: Discovering *Cryptococcus neoformans* capsule mutants. **Journal of Fungi**, v. 10, n. 2, p. 114, 2024.
20. BOVERS, Marjan; HAGEN, Ferry; BOEKHOUT, Teun. Diversity of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 25, n. 1, p. S4, 2008.
21. BUITRAGO-MEDINA, Daniel-Alejandro et al. La paloma (*Columba livia*) en la transmisión de enfermedades de importancia en salud pública. **Revista Ciencia Animal**, n. 6, p. 177-194, 2013.
22. CALIXTO, João B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.
23. CHANG, C. C. et al. Global guideline for the diagnosis and management of cryptococcosis: an initiative of the ECMM and ISHAM in cooperation with the ASM. **The Lancet infectious diseases**, v. 24, n. 8, p. e495–e512, 2024.
24. CHANG, Miwha et al. Roles of three *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* efflux pump-coding genes in response to drug treatment. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 4, p. e01751-17, 2018.
25. CHAVES, Mayecha Rayana Ventura et al. POTENCIAL FUNGICIDA DE PLANTAS MEDICINAIS DO CERRADO DA COSTA LESTE DO ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 6, n. 1, p. 71-80, 2018.

26. CHEN, Sharon C.-A. et al. Antifungal therapy and management of complications of cryptococcosis due to *Cryptococcus gattii*. **Clinical infectious diseases**, v. 57, n. 4, p. 543-551, 2013.
27. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: approved guideline**. M44, 3^a ed. Wayne, PA: CLSI, 2018.
28. COLOMBO, G. et al. Caracterização bioquímica e molecular de *Cryptococcus* spp. isolados de excretas ambientais de pombos (*Columba livia* doméstica). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, p. 1639-1645, 2015.
29. CUNHA, Fabíola Pessoa da et al. Development and optimization of extractives from *Astronium urundeuva* (allemão) Engl. by factorial design. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 647-652, 2009.
30. DA COSTA, Maysa Paula et al. Antifungal and cytotoxicity activities of the fresh xylem sap of *Hymenaea courbaril* L. and its major constituent fisetin. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, p. 1-7, 2014.
31. DA CRUZ, Jhonatas Emílio Ribeiro et al. Atividades antifúngicas e antibacterianas da planta medicinal jatobá (*Hymenaea courbaril* linneaus) de ocorrência no cerrado brasileiro: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 1, p. e22612139812-e22612139812, 2023.
32. DA FARMACOPEIA, Coordenação et al. Farmacopeia Brasileira: volume 1: 6^a edição. 2019.
33. DA SILVA GOMES, Vânia et al. Pombos urbanos *Columba livia* como agentes transmissores de infecções na cidade de araguaína-to. **Facit Business and Technology Journal**, v. 1, n. 20, 2020.
34. DAY, J. N. et al. Combination antifungal therapy for cryptococcal meningitis. **The New England journal of medicine**, v. 368, n. 14, p. 1291–1302, 2013.
35. DE ANDRADE, Beatriz Rayana Damásio et al. Avaliação do potencial antimicrobiano do extrato Etanólico de Folhas da Cecropia pachystachya t.(Embaúba). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e85101018679-e85101018679, 2021.
36. DESMARCHELIER, Cristian. Neotropics and natural ingredients for pharmaceuticals: why isn't South American biodiversity on the crest of the wave?. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 6, p. 791-799, 2010.
37. DESNOS-OLLIVIER, Marie et al. Cryptococcosis serotypes impact outcome and provide evidence of *Cryptococcus neoformans* speciation. **MBio**, v. 6, n. 3, p. 10.1128/mbio.00311-15, 2015.

38. DUARTE, Manoela Mendes et al. Morphological characterization of fruit, seed and seedling and germination of *Hymenaea courbaril* L.(Fabaceae)('Jatobá'). **Journal of Seed Science**, v. 38, n. 03, p. 204-211, 2016.
39. ELLABIB, Mohamed S. et al. Isolation, identification and molecular typing of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings and other environmental sources in Tripoli, Libya. **Mycopathologia**, v. 181, p. 603-608, 2016.
40. EVERTON, Gustavo Oliveira et al. Chemical characterization, toxicity, antioxidant and antimicrobial activity of the essential oils of *Hymenaea courbaril* L. and *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Ciência e Natura**, v. 43, p. e11-e11, 2021.
41. FANG, Wei; FA, Zhenzong; LIAO, Wanqing. Epidemiology of *Cryptococcus* and cryptococcosis in China. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 7-15, 2015.
42. FIRACATIVE, Carolina; MEYER, Wieland; CASTAÑEDA, Elizabeth. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* species complexes in Latin America: a map of molecular types, genotypic diversity, and antifungal susceptibility as reported by the Latin American Cryptococcal Study Group. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 4, p. 282, 2021.
43. FRANZOT, Sarah P. et al. Microevolution of a standard strain of *Cryptococcus neoformans* resulting in differences in virulence and other phenotypes. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 1, p. 89-97, 1998.
44. FRANZOT, Sarah P. et al. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* in Brazil and the United States: evidence for both local genetic differences and a global clonal population structure. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 9, p. 2243-2251, 1997.
45. FU, Man Shun et al. *Cryptococcus neoformans* urease affects the outcome of intracellular pathogenesis by modulating phagolysosomal pH. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 6, p. e1007144, 2018.
46. FUNES, Guillermo et al. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from droppings of the Feral Pigeon (*Columba livia*) found in public places in El Salvador. **Acta Médica Costarricense**, v. 64, n. 1, p. 52-57, 2022.
47. GONZÁLEZ-HEIN, Gisela; GONZÁLEZ-HEIN, Jaime; JARABRÁN, Maria C. Díaz. Isolation of *Cryptococcus neoformans* in dry droppings of captive birds in Santiago, Chile. **Journal of avian medicine and surgery**, v. 24, n. 3, p. 227-236, 2010.
48. GUIMARÃES, Denise Oliveira; MOMESSO, Luciano da Silva; PUPO, Mônica Tallarico. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química nova**, v. 33, p. 667-679, 2010.
49. GURUNG, Nista et al. Phytochemical Analysis and Bioactivity of Nepalese Medicinal Plants, with Compound Isolation from *Dischidia bengalensis* Colebr. **Natr Resour Human Health** ; 4 (3): 247-256, 2024.
50. GUSHIKEN, Alexis C.; SAHARIA, Kapil K.; BADDLEY, John W. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics**, v. 35, n. 2, p. 493-514, 2021.

51. HAGEN, Ferry et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal genetics and biology**, v. 78, p. 16-48, 2015.
52. HOWARD-JONES, Annaleise R. et al. Pulmonary cryptococcosis. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 11, p. 1156, 2022.
53. HSIAO, Po-Jen et al. Comparison of laboratory diagnosis, clinical manifestation, and management of pulmonary cryptococcosis: Report of the clinical scenario and literature review. **Clinica Chimica Acta**, v. 524, p. 78-83, 2022.
54. HSUEH, Po-Ren et al. Antifungal susceptibilities of clinical isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus* species from Taiwan: surveillance of multicenter antimicrobial resistance in Taiwan program data from 2003. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 512-517, 2005.
55. HUANG, Yunfei et al. Epidemiology of cryptococcal meningitis and fluconazole heteroresistance in *Cryptococcus neoformans* isolates from a teaching hospital in southwestern China. **Microbiology Spectrum**, v. 12, n. 8, p. e00725-24, 2024.
56. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE. (2023). Cidades brasileiras. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ma/caxias/panorama>
57. JARVIS, Joseph N. et al. Single-dose liposomal amphotericin B treatment for cryptococcal meningitis. **New England Journal of Medicine**, v. 386, n. 12, p. 1109-1120, 2022.
58. JOLY, Carlos A.; QUEIROZ, Helder Lima de. Pandemia, biodiversidade, mudanças globais e bem-estar humano. **Estudos avançados**, v. 34, n. 100, p. 67-82, 2020.
59. KHAN, Z. U. et al. *Cryptococcus neoformans* serotype A and *Cryptococcus gattii* serotype B isolates differ in their susceptibilities to fluconazole and voriconazole. **International journal of antimicrobial agents**, v. 33, n. 6, p. 559-563, 2009.
60. KWON-CHUNG, Kyung J. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, n. 7, p. a019760, 2014.
61. KWON-CHUNG, Kyung J.; POLACHEK, ITZHACK; BENNETT, JOHN E. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). **Journal of clinical microbiology**, v. 15, n. 3, p. 535-537, 1982.
62. LAZERA, M. S. et al. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. **Journal of medical and veterinary mycology**, v. 34, n. 2, p. 127-131, 1996.

63. Lee SC, Fung CP, Lee N, et al. Fluconazole disk diffusion test with méthylène blue and glucoseenriched Mueller-Hinton agar for determining susceptibility of *Candida* species. / **Clin Microbiol.** 2001;39:1615-1617
64. LI, Shu Shu; MODY, Christopher H. *Cryptococcus*. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 7, n. 3, p. 186-196, 2010.
65. LIMA, William Gustavo et al. Production of a phenolic-rich extract of aroeira honey and characterization of its antimicrobial, antitumoral and antioxidant activities. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 52, n. 1, 2023.
66. LINDSLEY, Mark D. et al. Evaluation of a newly developed lateral flow immunoassay for the diagnosis of cryptococcosis. **Clinical infectious diseases**, v. 53, n. 4, p. 321-325, 2011.
67. LIU, Kaixiong et al. Clinical analysis of non-AIDS patients pathologically diagnosed with pulmonary cryptococcosis. **Journal of thoracic disease**, v. 8, n. 10, p. 2813, 2016.
68. LOZANO-CHIU, M. et al. Detection of resistance to amphotericin B among *Cryptococcus neoformans* clinical isolates: performances of three different media assessed by using E-test and National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A methodologies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 10, p. 2817-2822, 1998.
69. MACHADO, A. C.; OLIVEIRA, Rodrigo Cardoso de. Medicamentos Fitoterápicos na odontologia: evidências e perspectivas sobre o uso da aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Allemão). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, p. 283-289, 2014.
70. MAESTRALE, Caterina et al. Genetic and pathological characteristics of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from meningoencephalitis in autochthonous goats and mouflons, Sardinia, Italy. **Veterinary microbiology**, v. 177, n. 3-4, p. 409-413, 2015.
71. MALEKIFARD, Mahdis; GHANIEI, Abolfazl; EIDI, Samaneh. Fungal isolation and identification from parrot excreta in northeast Iran: A threat to human health. **Veterinary Medicine and Science**, v. 9, n. 3, p. 1194-1200, 2023.
72. MARTINS, Julia Trevisan et al. Pesquisa epidemiológica da saúde do trabalhador: uma reflexão teórica. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 35, n. 1, p. 163-174, 2014.
73. MAZIARZ, Eileen K.; PERFECT, John R. Cryptococcosis. **Infectious disease clinics**, v. 30, n. 1, p. 179-206, 2016.
74. MEDEIROS RIBEIRO, Ângela et al. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* serotype D from Eucalypts in South Brazil. **Medical Mycology**, v. 44, n. 8, p. 707-713, 2006.
75. MIRPOURIAN, Seyyed Saed et al. Isolation, molecular identification, and phylogenetic evaluation of *Cryptococcus neoformans* isolated from pigeon lofts, Psittaciformes, and Passeriformes in Ahvaz, Iran. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 76, p. 101618, 2021.

76. MOUTINHO, Flavio Fernando Batista et al. Distribuição espaço-temporal das reclamações sobre pombos (*Columba livia* doméstica) efetuadas ao centro de controle de zoonoses de niterói, RJ (2009-2013). **Hygeia-Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 11, n. 21, p. 49-61, 2015.
77. NADROUS, Hassan F. et al. Pulmonary cryptococcosis in nonimmunocompromised patients. **Chest**, v. 124, n. 6, p. 2143-2147, 2003.
78. NAICKER, S. D. et al. Decreasing fluconazole susceptibility of clinical South African *Cryptococcus neoformans* isolates over a decade. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 3, p. e0008137, 2020.
79. NEGRONI, Ricardo. Cryptococcosis. **Clinics in dermatology**, v. 30, n. 6, p. 599-609, 2012.
80. NGAN, Nguyen Thi Thuy; FLOWER, Barnaby; DAY, Jeremy N. Treatment of Cryptococcal meningitis: how have we got here and where are we going?. **Drugs**, v. 82, n. 12, p. 1237-1249, 2022.
81. OLIVEIRA, Ykaro Richard et al. Ethnopharmacology of Anacardiaceae R. Br. from Northeast Brazil. **Scientia Naturalis**, v. 5, n. 1, 2023.
82. ORTÍZ-ARDILA, Andrés Eduardo et al. Antioxidant and antimicrobial capacity *Cecropia mutisiana* Mildbr. (Cecropiaceae) leave extracts. **Emir. J. Food Agric**, v. 29, p. 25-35, 2017.
83. PEREIRA, C. et al. Advances in the phytochemistry and biotechnological applications of *Cecropia distachya*. **Biotechnology Advances**, v. 41, p. 107882, 2023.
84. PERFECT, John R. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases**, v. 50, n. 3, p. 291-322, 2010.
85. PINHEIRO, Edilene de Araújo Diniz et al. Isolation of *Cryptococcus* spp. from several environmental niches in São Luís, MA. **Ciência e Natura**, v. 42, p. e7-e7, 2020.
86. REIS, Rosani Santos et al. *Cryptococcus neoformans* VNII as the main cause of cryptococcosis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 11, p. 980, 2021.
87. RIBEIRO, Daiany Alves et al. Promising medicinal plants for bioprospection in a Cerrado area of Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 3, p. 1522-1533, 2014.
88. RIVERA-MONDRAGÓN, Andrés et al. Pharmacognostic evaluation of ten species of medicinal importance of cecropia: current knowledge and therapeutic perspectives. **Planta Medica**, v. 87, n. 10/11, p. 764-779, 2021.

89. RIVERA-MONDRAGÓN, Andrés et al. Pharmacognostic evaluation of ten species of medicinal importance of *Cecropia*: current knowledge and therapeutic perspectives. **Planta Medica**, v. 87, n. 10/11, p. 764-779, 2021.
90. ROCHA, Juliana DB et al. Capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* modulate production of neutrophil extracellular traps (NETs) by human neutrophils. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 8008, 2015.
91. RODRIGUES, Hévelen Ferreira; MORAES, Melânia Santana; DE MESQUITA, Elieth Afonso. Incidência de criptococose em pombos (*Columba livia*) e seu impacto na saúde pública em Porto Velho/RO. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 15, p. e126111536931-e126111536931, 2022.
92. ROSA, Gilneia et al. Survey of *Cryptococcus neoformans* in pigeon (*Columba livia*) excreta in Public Square in Umuarama, Paraná, Brazil. **Afr. J. Microbiol. Res**, v. 10, n. 44, p. 1844-1848, 2016.
93. ROZENBAUM, Ronaldo et al. *Cryptococcus neoformans* varieties as agents of cryptococcosis in Brazil. **Mycopathologia**, v. 119, p. 133-136, 1992.
94. SABITU, Zainu Muhammad et al. Utility of Sunflower agar for laboratory detection of *Cryptococcus neoformans*. **Annals of Tropical Pathology**, v. 10, n. 2, p. 145-149, 2019.
95. SANTOS, Harvey M. et al. Common bacterial, viral, and parasitic diseases in pigeons (*Columba livia*): A review of diagnostic and treatment strategies. **Veterinary Microbiology**, v. 247, p. 108779, 2020.
96. SCARPARO, Nathalia Carolline; DOS SANTOS, Jordana Lima. USO DE NOVAS TECNOLOGIAS NA PROSPECÇÃO DE NOVOS ANTIBIÓTICOS. **Ensaio USF**, v. 5, n. 1, 2021.
97. SETIANINGRUM, Findra; RAUTEMAA-RICHARDSON, Riina; DENNING, David W. Pulmonary cryptococcosis: a review of pathobiology and clinical aspects. **Medical mycology**, v. 57, n. 2, p. 133-150, 2019.
98. SHI, Jiejun et al. Clinical, radiological, and laboratory features of HIV-negative pulmonary cryptococcosis with regard to serum lateral flow assay. **Frontiers in Medicine**, v. 11, p. 1234474, 2024.
99. SILVA, Dulce Helena Siqueira et al. Bioprospecting as a strategy for conservation and sustainable use of the Brazilian Flora. **Biota Neotropica**, v. 22, p. e20221356, 2022.
100. SILVA, Fabrício Brito et al. Evidências de mudanças climáticas na região de transição Amazônia-Cerrado no Estado do Maranhão. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v. 31, n. 3, p. 330-336, 2016.
101. SILVA, Flávia dos Santos et al. Antifungal activity of selected plant extracts based on an ethnodirected study. **Acta Botanica Brasilica**, v. 34, p. 442-448, 2020.

102. SOARES, Betânia Maria et al. Cerebral infection caused by *Cryptococcus gattii*: a case report and antifungal susceptibility testing. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 25, n. 4, p. 242, 2008.
103. SRICHATRAPIMUK, Sirawat; SUNGKANUPARPH, Somnuek. Integrated therapy for HIV and cryptococcosis. **AIDS research and therapy**, v. 13, p. 1-15, 2016.
104. SRIKANTA, Deepa; SANTIAGO-TIRADO, Felipe H.; DOERING, Tamara L. *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. **Yeast**, v. 31, n. 2, p. 47-60, 2014.
105. T RAMESHA, B. et al. Biodiversity and chemodiversity: future perspectives in bioprospecting. **Current drug targets**, v. 12, n. 11, p. 1515-1530, 2011.
106. TIAGO, Poliana Vicente et al. Caracterização morfoanatômica, fitoquímica e histoquímica de *Hymenaea courbaril* (Leguminosae), ocorrente na Amazônia Meridional. **Rodriguésia**, v. 71, p. e02182018, 2020.
107. TSAI, Y.-C.; YANG, Y.-S. Disseminated cryptococcosis. **QJM: An International Journal of Medicine**, p. hcae126, 2024.
108. VARMA, A.; KWON-CHUNG, K. J. Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 2303-2311, 2010.
109. VASCONCELOS, Ruben Horn et al. Feral pigeons (*Columba livia*) as potential reservoirs of *Salmonella* sp. and *Escherichia coli*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, p. e0412017, 2018.
110. VENA, Antonio et al. Fluconazole resistance is not a predictor of poor outcome in patients with cryptococcosis. **Mycoses**, v. 62, n. 5, p. 441-449, 2019.
111. VREULINK, Jo-Marie et al. Presence of pathogenic cryptococci on trees situated in two recreational areas in South Africa. **Fungal Ecology**, v. 30, p. 101-111, 2017.
112. ZAVALA, Sofia; BADDLEY, John W. Cryptococcosis. In: **Seminars in respiratory and critical care medicine**. Thieme Medical Publishers, 2020. p. 069-079

ANEXOS
ANÁLISE DA SUSCETIBILIDADE DE *Cryptococcus neoformans*
ISOLADOS DAS FEZES DE *Columba livia* NO MUNICÍPIO DE CAXIAS
MARANHÃO

SUSCEPTIBILITY ANALYSIS OF *Cryptococcus neoformans*
ISOLATED FROM THE FECES OF *Columba livia* IN CAXIAS
MARANHÃO

RESUMO

Introdução: O *Columba livia* foi introduzido no Brasil por volta do século XVI, sendo uma fonte importante na cadeia de transmissão de patógenos, como a criptococose, que tem como agente etiológico o *Cryptococcus neoformans* ou *Cryptococcus gattii*. Globalmente, observam-se recorrências de criptococose durante a terapia de manutenção, devido ao acesso limitado aos antifúngicos. No desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos, as plantas medicinais têm destaque, com pesquisas que demonstrando o potencial fungicida de diversas espécies. **Objetivos:** Esta pesquisa teve como objetivo analisar a suscetibilidade de isolados ambientais de *C. Neoformans* obtidos de fezes de *C. Livia*, frente a extratos vegetais brutos e a antifúngicos. **Metodologia:** Os testes de sensibilidade frente a extratos vegetais foram realizados por meio da técnica da difusão em ágar Mueller-Hinton, enquanto os testes com antifúngicos foram realizados através da técnica de difusão em disco. **Resultados:** Das 36 amostras, 69,44% apresentaram crescimento de colônias do fungo. Os testes de suscetibilidade das cepas de *C. Neoformans* frente aos extratos vegetais brutos demonstraram sensibilidade variável. A análise de variância apresentou um valor F de 26,42. Com um grau de liberdade para os tratamentos (Df=3f) e um valor de probabilidade extremamente significativo ($p=1,38 \times 10^{-9}$). **Conclusão:** este estudo demonstrou que ambientes no quais existem depósitos de excrementos de *C. Livia* são fontes para o crescimento e disseminação

do *Cryptococcus neoformans*. Os isolados fúngicos foram identificados fenotipicamente por meio de provas bioquímicas e por microscopia. As cepas fúngicas apresentaram padrão de resistência e suscetibilidade variados em relação aos extratos vegetais brutos e aos antifúngicos.

Palavras chaves: *C. livia*; *C. neoformans*; Extratos vegetais.

ABSTRACT

Introduction: *Columba livia* was introduced in Brazil around the 16th century, being an important source in the chain of transmission of pathogens such as cryptococcosis, which has as its etiological agent *Cryptococcus neoformans* or *Cryptococcus gattii*. Globally, cryptococcosis recurrences are observed during maintenance therapy due to limited access to antifungal agents. In the development of new antifungal drugs, medicinal plants have been highlighted, with research demonstrating the fungicidal potential of several species.

Objectives: This research aimed to analyze the susceptibility of environmental isolates of *C. Neoformans* obtained from feces of *C. Livia*, against crude plant extracts and antifungal.

Methodology: The sensitivity tests to plant extracts were performed using the technique of diffusion in agar Müller-Hinton, while the tests with antifungal were carried out using the disk diffusion technique. **Results:** Of the 36 samples, 69.44% showed growth of colonies of the fungus. The susceptibility tests of *C. Neoformans* strains against raw plant extracts showed variable sensitivity. The analysis of variance showed an F value of 26.42. With a degree of freedom for the treatments (Df=3f) and an extremely significant probability value ($p=1.38 \cdot 10^{-9}$). **Conclusion:** this study demonstrated that environments in which there are deposits of *C. Livia* excreta are sources for the growth and dissemination of *Cryptococcus neoformans*. The fungal isolates were identified phenotypically by biochemical tests and

microscopy. The fungal strains showed a pattern of resistance and susceptibility varied in relation to raw plant extracts and antifungals.

Key words: *C. livia*; *C. neoformans*; Plant extracts.

INTRODUÇÃO

O *Columba livia*, foi introduzido no Brasil por volta do século XVI, pelos Europeus e logo espalhou-se por todo o território nacional. Sendo considerada uma espécie doméstica, e possuindo características sinantrópicas, facilmente tornam-se reservatórios de agentes patogênicos para o homem e outros animais (DA SILVA GOMES et al., 2020; VASCONCELOS et al., 2018).

Albergando patógenos que são agentes etiológicos de diversas doenças, tais como a clamidiose, salmonelose, histoplasnose, toxoplasmose e a criptococose (SANTOS et al., 2020; RODRIGUES; MORAES; DE MESQUITA, 2022). A criptococose é decorrente da infecção do patógeno *Cryptococcus neoformans*, uma levedura encapsulada isolada pela primeira vez em 1894, e desde então, tem sido amplamente estudada devido à sua relevância clínica, sendo uma infecção fúngica de alta morbidade e alta mortalidade (CHANG et al., 2024).

A infecção ocorre principalmente através da inalação de esporos ou células fúngicas presentes no ambiente, tendo uma predileção pelo sistema nervoso central (SNC), podendo causar meningoencefalite criptocócica, uma condição inexoravelmente fatal (VU; GARCIA; GELLI, 2019; TSAY et al., 2019), além de outros órgãos que podem ser afetados como os pulmões, pele e os ossos (LEE, LIU, CHEN, 2024; BELDA JR et al., 2022). Pacientes com HIV/AIDS, receptores de transplantes de órgãos e indivíduos com outras formas de imunossupressão estão em maior risco de desenvolver a doença, devido à sua incapacidade de montar uma resposta imunológica eficaz contra o fungo (MOLLOY et al, 2018).

As principais drogas utilizadas para tratamento da criptococose são a anfotericina B com associação da flucitosina, e o fluconazol como primeira linha dentre os triazóis para terapia de manutenção ou profilaxia (XU et al., 2019; ZHAO et al., 2022). No entanto, a crescente resistência aos antifúngicos é uma preocupação, devido a quantidade restrita de opções farmacológicas disponíveis na atualidade, ressaltando assim a necessidade de novos tratamentos e estratégias terapêuticas (NAICKER et al., 2020; BASTOS et al., 2021).

Nesse contexto destacam-se as plantas, que são capazes de produzir um grande número de compostos bioativos, derivados dos metabólitos secundários e fitoquímicos com potencial para a descoberta de novas terapias (ALTEMIMI et al., 2017; ANAND et al., 2019). Dada a importância clínica do *Cryptococcus neoformans* e a crescente preocupação com a resistência aos antifúngicos, o objetivo do presente estudo é investigar a suscetibilidade antifúngica de isolados ambientais de *C. neoformans* obtidos de fezes de *C. livia*, frente a extratos vegetais brutos.

METODOLOGIA

Local de estudo

Para o isolamento das cepas ambientais de *Cryptococcus* coletou-se fezes de *Columba livia*, em ambientes urbanos no município de Caxias, Maranhão, Brasil, município este que possui uma área territorial de 5.201,927 km², apresentando uma população estimada em 156.970 habitantes em 2022 e uma densidade demográfica de 30,18 habitantes/km², banhado pelo Rio Itapecuru e com clima tropical, situando-se na região Leste do Estado do Maranhão, a 374 km da capital maranhense, São Luís, e 70 km da capital piauiense, Teresina (IBGE, 2023).

Os locais de coleta foram definidos com base no fluxo relevante de pessoas e maior concentração de *C. livia* próximo a Hospitais, Escolas e Universidades. No qual coletou-se 36

amostras em 12 pontos diferentes no período de Maio a Julho de 2024. Sendo somente fezes envelhecidas e secas provenientes do *C. livia*.

No qual realizou-se a suspensão de aproximadamente de 1g de fezes para 10mL de solução salina (0.9%) e agitadas em vórtex por três minutos, deixando repousar por 30 minutos à temperatura ambiente, metodologia adaptada de Malekifard; Ghaniei; Eidi, (2023).

Todas as amostras tiveram o sobrenadante semeado por esgotamento, em placas de Petri, cada uma contendo meio de cultura Ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e incubadas a 30°C por um período de 7 dias, conforme a metodologia original proposta por Franzot et al., (1998).

Isolamento e identificação fúngica

A identificação do *C. neoformans* foi realizada pelas características das colônias, de coloração marrons/amareladas e com aspecto viscoso em ágar, além de testes bioquímicos realizados através do crescimento dos isolados em azul de bromotimol de creatinina dextrose em meio de timina seguindo ainda a metodologia de Franzot et al., (1997).

O meio ureia-ágar-base foi utilizado para identificar o gênero *Cryptococcus* (FU et al., 2018). Os isolados foram repicados nesse meio e incubados a 30°C por cinco dias. E para diferenciar as espécies de *C. neoformans* e *C. gattii*, foi utilizado o meio canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB), seguindo a metodologia original de KWON-CHUNG, POLACHEK, BENNETT (1982).

Repiques sucessivos dos microrganismos isolados foram realizados com a finalidade de obtenção de colônias puras. As cápsulas fúngicas foram observadas por microscopia para a identificação fenotípica do *C. neoformans* através de coloração por tinta da china. Outros padrões de identificação foram realizados pela termotolerância a 37° C, inibição a cicloheximida e produção de urease.

Avaliação da sensibilidade fúngica

Os testes de sensibilidade frente a antifúngicos foram realizados por meio da técnica de difusão em disco em ágar Mueller-Hinton, suplementado com 2% glicose e 0,5 g/mL de azul de metileno seguindo diretrizes do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI M44), no qual utilizou-se discos impregnados com fluconazol (25 mcg), itraconazol (10 mcg), ketoconazol (50mcg), e anfotericina B (100 mcg) (Cecon-Sensifungidisc, São Paulo, Brasil).

Com os seguintes valores de corte da **Tabela 1**:

Tabela 1: Valores de corte para fluconazol, itraconazol, ketoconazol, e anfotericina B, baseando-se como controle espécie de *Cândida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6528 .

Antifúngico	S	I	R
Anfotericina B	> 10 mm	Não aplicável	≤ 10 mm
Itraconazol	≥ 20 mm	12–19 mm	≤ 11 mm
Fluconazol	≥ 19 mm	14–18 mm	≤ 13 mm
Ketoconazol	≥ 28 mm	21–27 mm	≤ 20 mm

Fonte: CLSI (M44), 2018.

S = Suscetível; I = Intermediário; R = Resistente.

Extratos vegetais

Os testes de sensibilidade frente aos extratos vegetais foram realizados utilizando-se da técnica por difusão em ágar, na qual em uma placa padrão de 90 mm, realizou-se o plaqueamento com ágar-ágar, e após a solidificação, inoculou-se diretamente no ágar Mueller-Hinton com uma alça bacteriológica uma massa celular de *C. neoformans*, e agitou-se em vórtex para que fosse depositado na superfície da placa. Então, após a solidificação um furo de diâmetro de 6 mm aproximadamente foi perfurado, de maneira asséptica com uma ponta

estéril, e um volume 20 µL da solução do extrato foi introduzido no poço (BALOUIRI, SADIKI, IBNSOUDA, 2016; GURUNG et al., 2024).

Os extratos foram obtidos seguindo as recomendações da Farmacopeia Brasileira (2019). Onde após a coleta, os espécimes foram postos para secagem à sombra, em ambiente arejado durante um período de 7 dias. A trituração dos vegetais foi realizada em moinho de facas até a condição de pó, em sequência, adicionado ao pó solvente metanol, que permaneceu em repouso por 21 dias sob condição de agitação diária. Após esse período, o material foi filtrado e depositado em um evaporador rotativo a 40°C entre 70-80 rpm para retirada de todo o solvente. Os órgãos utilizados para obtenção dos extratos foram: a casca do tronco da *Hymenaea courbaril* L., casca do tronco da *Astronium urundeuva* (M.Allemão) Engl., e as folhas da *Cecropia distachya* Huber.

A identificação das espécies dos vegetais foi realizada pela botânica Dra. Laice Fernanda Gomes de Lima e o botânico Guilherme Sousa da Silva, e depositadas no herbário Professor Aluizio Bittencourt – HABIT, com número de tombo 5067, xxxx, e 5066 respectivamente.

Análise estatística

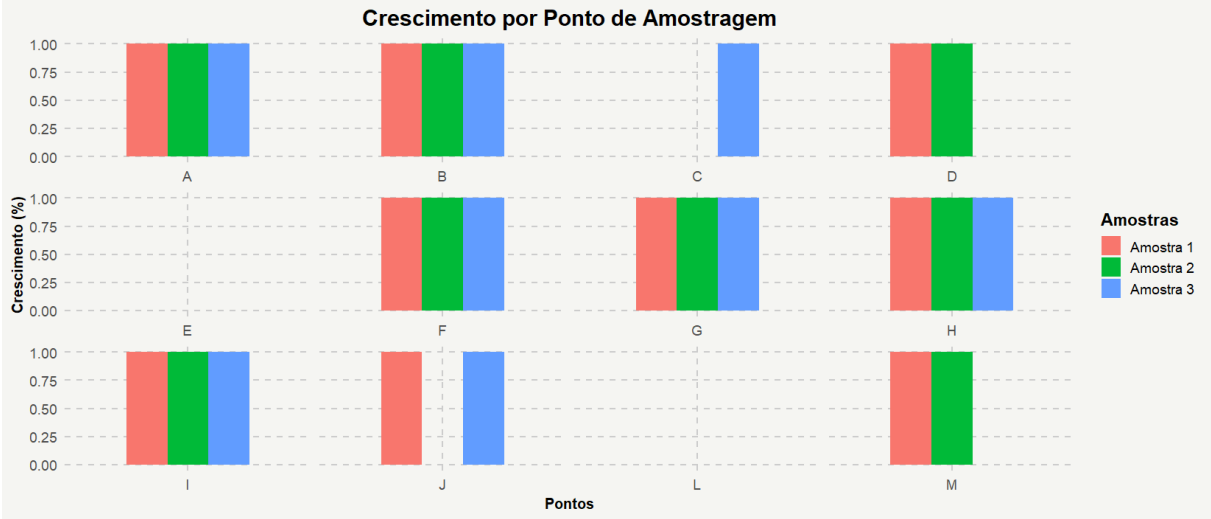
Todos os dados foram analisados usando o programa RStudio (R version 4.4.2). utilizando três testes comparativos – ANOVA, Teste de Tkey, e Teste de Homogeneidade. Os valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

Das 36 amostras 25 (69,44%) apresentaram crescimento de colônias do fungo. No meio de cultura Canavanina-glicina-azul de bromotiol (CGB) não houve alteração na

coloração indicando que as leveduras eram *C. neoformans*, e não *C. gatti* (**Figura 1**), através da coloração por tinta da china, observou-se a presença de leveduras encapsuladas.

Figura 1. Gráfico representativo dos 12 pontos de coletas (nomeados de A-M), com crescimento de leveduras de *Cryptococcus neoformans*. Caxias-MA. N=12



Fonte: Autoria própria, 2025.

Avaliação da sensibilidade fúngica

Os testes de suscetibilidade das cepas de *C. neoformans* frente aos extratos brutos dos vegetais demonstraram sensibilidade variável como observado no **quadro 1**.

QUADRO 1. Perfis de suscetibilidade de isolados de *C. neoformans* em relação aos extratos brutos dos vegetais utilizados na pesquisa. Caxias-MA, 2024. N=12.

Amostra	Extrato A	Extrato B	Extrato C	Fluconazol
A	26,66 mm	21,33 mm	R	R
B	24 mm	35,33 mm	R	R
C	27,33 mm	30,66 mm	R	R
D	32 mm	31,33 mm	12,5 mm	R
E	SC	SC	SC	SC
F	25,33 mm	28 mm	R	R
G	20 mm	24,66 mm	R	R
H	40 mm	37,33 mm	20 mm	42 mm
I	31,33 mm	32 mm	R	R
J	29,33 mm	30,66 mm	R	11 mm
L	SC	SC	SC	SC

M	29,33 mm	29,33 mm	R	R
C. <i>neoformans</i> (ATCC 32045)	15,33 mm	12,33 mm	R	15 mm

Fonte: Autoria própria, 2024.

SC= Sem crescimento; **MM** = milímetro; **R**= resistente; **Extrato A**= *H. courbaril*; **Extrato B**= *A. urundeuva*; **Extrato C**= *C. distachya*; **ATCC** = American Type Culture Collection.

Os resultados da análise estatística demonstraram diferenças significativas entre os tratamentos avaliados. A análise de variância (ANOVA) apresentou um valor F de 26,42. Df=3f e um valor de $p=1,38 \times 10^9$, demonstrando que as médias dos tratamentos são estatisticamente diferentes.

O teste de Tukey permitiu comparar os pares de tratamentos. Determinando que o extrato C é significativamente diferente do extrato A ($p=0,0000005$) e do extrato B ($p=0,0000002$). O fluconazol também apresentou diferenças significativas em relação ao extrato A ($p=0,0000078$) e ao extrato B ($p=0,0000030$).

Não foram observadas diferenças significativas entre o extrato A e o extrato B ($p=0,9904$), nem entre o fluconazol e o extrato C ($p=0,8220$). E o teste de homogeneidade de variâncias de Levene foi aplicado para verificar a adequação dos pressupostos do modelo. O resultado ($p=0,8324$) confirmou que as variâncias dos grupos são homogêneas.

O extrato bruto de *H. courbaril* apresentou inibição significativa em todas as cepas analisadas no estudo. O extrato de *A. urundeuva*, também apresentou capacidade inibitória das cepas de *C. neoformans*. Com relação ao extrato bruto de *C. distachya* observou-se resistência em 80% das cepas de *C. neoformans* com atividade inibitória somente em 10% das cepas.

Com base nos resultados obtidos no **Quadro 1**, os extratos brutos A e B inibiram o crescimento das cepas ambientais de *C. neoformans* utilizadas na pesquisa. Assim, essas espécies vegetais podem ser uma opção na busca de novas drogas para o tratamento da criptococose.

O fluconazol foi utilizado como controle positivo, porém, apresentou uma alta taxa de resistência (90%), possuindo uma atividade inibitória significativa somente em 10% das cepas de *C. neoformans*. dos 2 isolados de *C. neoformans* que apresentaram suscetibilidade a essa droga, 1 foi dose dependente (**Quadro 1**).

O fluconazol é uma das principais drogas utilizadas no tratamento de infecções ocasionadas pelo *C. neoformans* em seres humanos, entretanto, os resultados demonstraram um dado importante, a resistência de cepas de *C. neoformans* ambientais a esse antifúngico, o que pode ser um dado epidemiológico muito interessante, haja vista, que as pessoas da comunidade estão expostas a esse patógeno, principalmente em logradouros públicos.

Outro dado importante quanto à resistência de cepas de *C. neoformans* ambientais ao fluconazol é o fato do *C. livia* ser encontrado próximo a ambientes hospitalares, o que aumenta a possibilidade de infecção de pessoas em imunossupressão.

Quanto aos testes de suscetibilidade realizados pelo método de Kirb-Bauer, com as cepas de *C. neoformans* frente aos antifúngicos (Anfotericina B, Fluconazol, Itraconazol e Ketonazol) comumente utilizados no tratamento de infecções por essa levedura, os resultados demonstraram que cepas desse fungo foram resistentes a parte desses antifúngicos, corroborando com a resistência observada ao fluconazol (**Quadro 2**).

QUADRO 2. Perfis de suscetibilidade de cepas *C. neoformans* ambientais frente aos antifúngicos Anfotericina B, Fluconal, Itraconazol e Ketoconazol. Caxias-MA, 2024. N=12.

Amostra	Anfotericina b	Fluconazol	Intraconazol	Ketoconazol
A	20 mm	R	R	R
B	R	R	R	R
C	R	R	R	R
D	R	R	R	R
E	SC	SC	SC	SC
F	R	R	R	R
G	R	R	R	R
H	20 mm	18 mm	R	R
I	R	R	R	R
J	28 mm	28 mm	18 mm	20 mm
L	SC	SC	SC	SC
M	22 mm	R	R	R

Fonte: Autoria própria, 2024.

Legenda: SC = sem crescimento microbiano; MM = milímetro; R= resistente (não houve desenvolvimento do halo de inibição), S = sensível (houve desenvolvimento do halo de inibição) em mm, incluindo o próprio disco de 6 mm.

Observou-se no **Quadro 2**, um elevado número de cepas de *C. neoformans* resistentes à anfotericina B e ao itraconazol. Esses dados demonstram que cepas desse fungo, encontradas no meio ambiente apresentando resistência a essas duas drogas em particularmente, pode ser um grave problema em saúde pública na atualidade, levando em consideração, que essas cepas podem infectar pessoas da comunidade e facilmente levar a morte dos infectados dado à resistência aos antifúngicos mais potentes.

DISCUSSÃO

É descrito na literatura que altas temperaturas pode diminuir a possibilidade do *Cryptococcus* sobreviver no meio ambiente (ARAÚJO JUNIOR et al., 2015), porém, mesmo as coletas sendo realizadas em um período de Maio a Julho de 2024, no qual a temperatura mante-se elevada (SILVA et al., 2016), não foi impedimento para o crescimento fúngico, obtendo-se colônias puras e exuberantes.

A presença significativa de *Cryptococcus* em fezes de *C. livia* em ambientes de grande circulação é um problema de ordem sanitária e de saúde pública pois favorece a infecção por essas cepas, pelo fato do *C. neoformans* ser caracterizado pela capacidade de disseminar-se tanto em pacientes imunocrompetidos como em hospedeiros aparentemente imunocopetentes (MAZIARZ; PERFECT, 2016), isso ocorre principalmente através da inalação de esporos de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* na forma de levedura ou basidiósporos, de origem ambiental (ZAVALA, BADDLEY, 2020; LIU, 2016).

A infecção por essas cepas pode ocasionar uma criptococose pulmonar, na qual grande parte dos infectados são assintomáticos, e aqueles que apresentam sintomas podem apresentar quadros de tosse, dispneia, febre, suores noturnos, hemoptise e dor torácica pleurítica

(HOWARD-JONES et al., 2022; SETIANINGRUM, RAUTEMAA-RICHARDSON, DENNING, 2019; HSIAO et al., 2022). Essa levedura possui uma predileção pelo sistema nervoso central (SNC), tendo como manifestação clássica o desenvolvimento de meningoencefalite, uma condição potencialmente fatal, de alta morbidade e alta mortalidade, podendo ocorrer ainda infecções combinadas entre o SNC e pulmonar, além da possibilidade do desenvolvimento de uma forma sistêmica (HOWARD-JONES et al., 2022; CHANG et al., 2024).

Pesquisadores brasileiros analisaram excrementos de *C. livia*, mas, o *C. neoformans* não foi detectado nas amostras, porém, ainda sim ressaltaram que as cepas de *Cryptococcus* podem sobreviverem no ambiente por cerca de até 2 anos é necessário o alerta para as autoridades sanitárias, visto a presença de fezes de *C. livia* no meio ambiente (ROSA et al., 2016). Em antagonismo, Pinheiro et al. (2020), conseguiram isolar o *C. neoformans* das fezes de *C. livia*, além de outros tipos de fungos como *Candida* spp. e *Rhodotorula* spp.. Demonstrando assim que o *C. livia* é um grande disseminador de patógenos. Com o isolamento dessa levedura, em fezes de *C. livia* sendo descrito em várias regiões do mundo (FUNES et al., 2022; ELLABIB et al., 2016; MIRPOURIAN et al., 2021; GONZÁLEZ-HEIN, GONZÁLEZ-HEIN, JARABRÁN, 2010).

A presença dessas cepas no ambiente além de proporcionar uma maior probabilidade de contato com seres humanos, preocupa devido aos crescentes relatos de resistência as drogas azólicas (VENA et al., 2019), na qual diferentes metodologias em vitro demonstraram certo nível de resistência a essa classe farmacológica em especial ao fluconazol, com alguns isolados sendo capazes até de adaptarem-se a níveis de fluconazol de 64 a 256 µg/ml (VARMA, KWON-CHUNG, 2010).

Um estudo com cepas de isolados clínicos de *Cryptococcus* comparou a resistência do fungo a fluconazol em dois períodos de incubação, no qual observou-se que em um período

de incubação de 48 horas o resultado da difusão em disco (Kirby-Bauer) indicou que 27,1% das cepas eram resistentes, e as cepas incubadas durante 72 horas 54,2% eram resistentes (HUANG et al., 2024). A resistência a anfotericina B gera grande preocupação, visto que é a droga de primeira escolha para o tratamento da criptococose (JARVIS et al., 2022).

Na terapia da meningite criptocócica a anfotericina B, é em muitas vezes utilizadas em combinação com flucitosina, seguida por uma fase de manutenção com fluconazol para prevenir recaídas (JARVIS et al., 2022; NGAN, FLOWER, DAY, 2022). Em infecções pulmonares e outras formas menos graves, o fluconazol ou itraconazol são frequentemente utilizados. Sendo a profilaxia a longo prazo com fluconazol comum em pacientes com AIDS para prevenir recidivas (HOWARD-JONES et al., 2022; ZAVALA; BADDLEY, 2020).

Não é atual os relatos de resistência de *Cryptococcus* a anfotericina B com estudos já em 1998 demonstrando certo grau de resistência a essa droga (LOZANO-CHIU et al., 1998), confirmando-se ao longo do tempo (HSUEH et al., 2005). O que é alarmante visto que em alguns lugares a terapia associada com anfotericina B e flucitosina não está disponível, sendo o uso isolado da anfotericina B a única opção terapêutica para a criptococose, sabe-se que a associação entre as duas drogas aumenta capacidade de morte fúngica, isso foi relatado em estudo no qual observou-se em vitro que a sinergia entre a Anfotericina B e a 5-flucitosina (SOARES et al., 2008).

Não se sabe por completo como ocorre a resistência do *Cryptococcus* spp, o que já é descrito é que a hibridização entre *Cryptococcus* spp. influencia o desenvolvimento dessa resistência, alguns trabalhos sugerem que a resistência aos azóis por exemplo está relacionada ao alterações em um gene que codifica a enzima lanosterol 14 α -desmetilase, o gene ERG11 (BERMA; GEDDES-MCALISTER, 2020). Outro ator importante é a melanina presente na capsula fúngica, que se acredita impedir que o medicamento atinja o local alvo (KHAN et al., 2009).

Tendo em vista o surgimento de resistência aos antifúngicos, novas estratégias fazem-se necessárias para vencer essa barreira, e a biodiversidade existente no Brasil pode fornecer uma fonte potencial para a descobertas de novos fármacos, sendo considerada a maior do mundo, detentora de aproximadamente 20% das espécies do globo, a biodiversidade brasileira pode ser vista como uma grande farmácia ao ar livre, e ainda nos dias atuais no qual a grande parte dos medicamentos são de origem sintéticas, mais de 40% dos medicamentos disponíveis na indústria farmacêutica, e 70% dos antibióticos e anticancerígenos são oriundos da natureza (CALIXTO, 2003; JOLY, QUEIROZ, 2020).

Algumas espécies de uso popular vêm sendo destaque na literatura, pela capacidade de inibição do crescimento de alguns fungos, dentre elas destacam-se aquelas do gênero *Hymenaea* spp. em especial a *H. courbaril*, na qual sua seiva já foi descrita com capacidade de inibir o crescimento de fungo dermatófitos e do complexo de espécies *C. neoformans* (DA COSTA et al., 2014). Possuindo ainda atividade antimicrobiana a outros microrganismos, inclusive contra bactérias multirresistentes (EVERTON et al., 2021; ALEIXO et al., 2015).

Nessa mesma linha destaca-se a *A. urundeuva* com atividade antifúngica contra *Candida albicans* e *C. glabrata* (BONIFÁCIO et al., 2019; BONIFÁCIO et al., 2024), e ação antimicrobiana significativa contra bactérias Gram-negativas (LIMA et al., 2023). Um estudo realizado com diversos extratos, determinou que o *C. neoformans* é sensível a diversos extratos vegetais, dentre esses extratos o de *A. urundeuva*, demonstrando atividade fungicida considerável (SILVA et al., 2020).

Não existem muitos estudos sobre a capacidade antifúngica de espécies do gênero *Cecropia*, porém, sabe-se que algumas espécies apresentam substâncias como triterpenos, terpenóides, lactonas sesquiterpênicas, flavonóides, fenóis, e glicosídeos flavonóides, compostos esses com ações farmacológicas antimicrobianas, citotóxicas e antitumoral (ORTÍZ-ARDILA et al., 2017; ALVES et al., 2019). Apesar da não atividade observada neste

trabalho, existem estudos que através de técnicas semelhantes demonstraram uma atividade considerável de espécies de *Cecropia*, em especial a *C. pachystachya* frente a fungos e bactérias patogênicas como *Staphylococcus aureus*, *S. pyogenes* e *C. albicans* (DE ANDRADE et al., 2021).

CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que ambientes no quais existem depósitos de excrementos de *C. livia*, especialmente em áreas urbanas no qual existe um com fluxo considerável de seres humanos são fontes para o crescimento e disseminação de *Cryptococcus neoformans* o que aumenta a possibilidade de infecção por esse fungo. Cepas essas que apresentaram resistência a drogas utilizadas com frequência na terapêutica da criptococose, como o fluconazol, Anfotericina B, Intraconazol e Ketoconazol.

No entanto as mesmas cepas apresentaram suscetibilidade significativa frente aos extratos brutos de *Hymenaea courbaril* e *Astronium urundeuva*, o que pode ser um direcionamento para o aprofundamento das investigações em busca de substâncias ativas com capacidade antimicrobiana, visando abrir uma uma válvula de escape para a barreira da resistência microbiana.

REFERÊNCIAS

1. ALEIXO, Álan Alex et al. Synergistic activity from *Hymenaea courbaril* L. and *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville against multidrug-resistant bacteria strains. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, n. 26, p. 741-748, 2015
2. ALTEMIMI, Ammar et al. Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. **Plants**, v. 6, n. 4, p. 42, 2017.
3. ALVES, Georgia de Assis Dias et al. *Cecropia obtusa* extract and chlorogenic acid exhibit anti aging effect in human fibroblasts and keratinocytes cells exposed to UV radiation. **PLoS One**, v. 14, n. 5, p. e0216501, 2019.

4. ANAND, Uttpal et al. A comprehensive review on medicinal plants as antimicrobial therapeutics: potential avenues of biocompatible drug discovery. **Metabolites**, v. 9, n. 11, p. 258, 2019.
5. ARAÚJO JUNIOR, Erivelto Corrêa de et al. Cryptococcus: isolamento ambiental e caracterização bioquímica. **Arquivo Brasileiro de Medicina veterinária e zootecnia**, v. 67, p. 1003-1008, 2015.
6. BALOUIRI, Mounyr; SADIKI, Moulay; IBNSOUDA, Saad Koraichi. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of pharmaceutical analysis**, v. 6, n. 2, p. 71-79, 2016.
7. BASTOS, Rafael W. et al. Fungicide effects on human fungal pathogens: cross-resistance to medical drugs and beyond. **PLoS Pathogens**, v. 17, n. 12, p. e1010073, 2021.
8. BELDA JR, Walter et al. Primary cutaneous cryptococcosis caused by *Cryptococcus gatti* in an elderly patient. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 7, n. 9, p. 206, 2022.
9. BERMAS, Arianne; GEDDES-MCALISTER, Jennifer. Combatting the evolution of antifungal resistance in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular microbiology**, v. 114, n. 5, p. 721-734, 2020.
10. BONIFÁCIO, Bruna Vidal et al. Anti-*Candida* sp. activity of *Astronium urundeuva* derivatives free and loaded into a nanostructured lipid system. **Chemical Papers**, v. 78, n. 2, p. 973-979, 2024.
11. BONIFÁCIO, Bruna Vidal et al. Antifungal activity of a hydroethanolic extract from *Astronium urundeuva* leaves against *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2642, 2019.
12. CALIXTO, João B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.
13. CHANG, C. C. et al. Global guideline for the diagnosis and management of cryptococcosis: an initiative of the ECMM and ISHAM in cooperation with the ASM. **The Lancet infectious diseases**, v. 24, n. 8, p. e495–e512, 2024.
14. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: approved guideline**. M44, 3ª ed. Wayne, PA: CLSI, 2018.
15. DA COSTA, Maysa Paula et al. Antifungal and cytotoxicity activities of the fresh xylem sap of *Hymenaea courbaril* L. and its major constituent fisetin. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, p. 1-7, 2014.
16. DA FARMACOPEIA, Coordenação et al. Farmacopeia Brasileira: volume 1: 6ª edição. 2019.

17. DA SILVA GOMES, Vânia et al. Pombos urbanos columba livia como agentes transmissores de infecções na cidade de araguaína-to. **Facit Business and Technology Journal**, v. 1, n. 20, 2020.
18. DE ANDRADE, Beatriz Rayana Damásio et al. Avaliação do potencial antimicrobiano do extrato Etanólico de Folhas da Cecropia pachystachya t.(Embaúba). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e85101018679-e85101018679, 2021.
19. ELLABIB, Mohamed S. et al. Isolation, identification and molecular typing of Cryptococcus neoformans from pigeon droppings and other environmental sources in Tripoli, Libya. **Mycopathologia**, v. 181, p. 603-608, 2016.
20. EVERTON, Gustavo Oliveira et al. Chemical characterization, toxicity, antioxidant and antimicrobial activity of the essential oils of Hymenaea courbaril L. and Syzygium cumini (L.) Skeels. **Ciência e Natura**, v. 43, p. e11-e11, 2021.
21. FRANZOT, Sarah P. et al. Microevolution of a standard strain of Cryptococcus neoformans resulting in differences in virulence and other phenotypes. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 1, p. 89-97, 1998
22. FRANZOT, Sarah P. et al. Molecular epidemiology of Cryptococcus neoformans in Brazil and the United States: evidence for both local genetic differences and a global clonal population structure. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 9, p. 2243-2251, 1997.
23. FU, Man Shun et al. Cryptococcus neoformans urease affects the outcome of intracellular pathogenesis by modulating phagolysosomal pH. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 6, p. e1007144, 2018.
24. FUNES, Guillermo et al. Isolation of Cryptococcus neoformans from droppings of the Feral Pigeon (Columba livia) found in public places in El Salvador. **Acta Médica Costarricense**, v. 64, n. 1, p. 52-57, 2022
25. GONZÁLEZ-HEIN, Gisela; GONZÁLEZ-HEIN, Jaime; JARABRÁN, Maria C. Díaz. Isolation of Cryptococcus neoformans in dry droppings of captive birds in Santiago, Chile. **Journal of avian medicine and surgery**, v. 24, n. 3, p. 227-236, 2010.
26. GURUNG, Nista et al. Phytochemical Analysis and Bioactivity of Nepalese Medicinal Plants, with Compound Isolation from Dischidia bengalensis Colebr. **Natr Resour Human Health** ; 4 (3): 247-256, 2024.
27. HOWARD-JONES, Annaleise R. et al. Pulmonary cryptococcosis. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 11, p. 1156, 2022.
28. HSIAO, Po-Jen et al. Comparison of laboratory diagnosis, clinical manifestation, and management of pulmonary cryptococcosis: Report of the clinical scenario and literature review. **Clínica Chimica Acta**, v. 524, p. 78-83, 2022.

29. HSUEH, Po-Ren et al. Antifungal susceptibilities of clinical isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus* species from Taiwan: surveillance of multicenter antimicrobial resistance in Taiwan program data from 2003. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 512-517, 2005.
30. HUANG, Yunfei et al. Epidemiology of cryptococcal meningitis and fluconazole heteroresistance in *Cryptococcus neoformans* isolates from a teaching hospital in southwestern China. **Microbiology Spectrum**, v. 12, n. 8, p. e00725-24, 2024.
31. HUDZICKI, Jan. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. **American society for microbiology**, v. 15, n. 1, p. 1-23, 2009.
32. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE. (2023). Cidades brasileiras. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ma/caxias/panorama>
33. JARVIS, Joseph N. et al. Single-dose liposomal amphotericin B treatment for cryptococcal meningitis. **New England Journal of Medicine**, v. 386, n. 12, p. 1109-1120, 2022.
34. JOLY, Carlos A.; QUEIROZ, Helder Lima de. Pandemia, biodiversidade, mudanças globais e bem-estar humano. **Estudos avançados**, v. 34, n. 100, p. 67-82, 2020.
35. KHAN, Z. U. et al. *Cryptococcus neoformans* serotype A and *Cryptococcus gattii* serotype B isolates differ in their susceptibilities to fluconazole and voriconazole. **International journal of antimicrobial agents**, v. 33, n. 6, p. 559-563, 2009.
36. KWON-CHUNG, Kyung J.; POLACHEK, ITZHACK; BENNETT, JOHN E. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). **Journal of clinical microbiology**, v. 15, n. 3, p. 535-537, 1982.
37. LEE, Yang-Ming; LIU, Yuag-Meng; CHEN, Tsung-Chia. Disseminated *Cryptococcus neoformans* infection involving multiple bones and lung in an immunocompetent patient: a case report. **BMC Infectious Diseases**, v. 24, n. 1, p. 397, 2024.
38. LIMA, William Gustavo et al. Production of a phenolic-rich extract of aroeira honey and characterization of its antimicrobial, antitumoral and antioxidant activities. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 52, n. 1, 2023.
39. LIU, Kaixiong et al. Clinical analysis of non-AIDS patients pathologically diagnosed with pulmonary cryptococcosis. **Journal of thoracic disease**, v. 8, n. 10, p. 2813, 2016.
40. LOZANO-CHIU, M. et al. Detection of resistance to amphotericin B among *Cryptococcus neoformans* clinical isolates: performances of three different media

assessed by using E-test and National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A methodologies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 10, p. 2817-2822, 1998.

41. MALEKIFARD, Mahdis; GHANIEI, Abolfazl; EIDI, Samaneh. Fungal isolation and identification from parrot excreta in northeast Iran: A threat to human health. **Veterinary Medicine and Science**, v. 9, n. 3, p. 1194-1200, 2023.
42. MAZIARZ, Eileen K.; PERFECT, John R. Cryptococcosis. **Infectious disease clinics**, v. 30, n. 1, p. 179-206, 2016.
43. MIRPOURIAN, Seyyed Saed et al. Isolation, molecular identification, and phylogenetic evaluation of *Cryptococcus neoformans* isolated from pigeon lofts, Psittaciformes, and Passeriformes in Ahvaz, Iran. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 76, p. 101618, 2021.
44. MOLLOY, S. F. et al. Antifungal combinations for treatment of cryptococcal meningitis in Africa. **The New England journal of medicine**, v. 378, n. 11, p. 1004–1017, 2018.
45. NAICKER, S. D. et al. Decreasing fluconazole susceptibility of clinical South African *Cryptococcus neoformans* isolates over a decade. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 3, p. e0008137, 2020.
46. NGAN, Nguyen Thi Thuy; FLOWER, Barnaby; DAY, Jeremy N. Treatment of Cryptococcal meningitis: how have we got here and where are we going?. **Drugs**, v. 82, n. 12, p. 1237-1249, 2022.
47. ORTÍZ-ARDILA, Andrés Eduardo et al. Antioxidant and antimicrobial capacity *Cecropia mutisiana* Mildbr.(Cecropiaceae) leave extracts. **Emir. J. Food Agric**, v. 29, p. 25-35, 2017.
48. PINHEIRO, Edilene de Araújo Diniz et al. Isolation of *Cryptococcus* spp. from several environmental niches in São Luís, MA. **Ciência e Natura**, v. 42, p. e7-e7, 2020.
49. RODRIGUES, Hévellem Ferreira; MORAES, Melânia Santana; DE MESQUITA, Elieth Afonso. Incidência de criptococose em pombos (*Columba livia*) e seu impacto na saúde pública em Porto Velho/RO. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 15, p. e126111536931-e126111536931, 2022.
50. ROSA, Gilneia et al. Survey of *Cryptococcus neoformans* in pigeon (*Columba livia*) excreta in Public Square in Umuarama, Paraná, Brazil. **Afr. J. Microbiol. Res**, v. 10, n. 44, p. 1844-1848, 2016.
51. SANTOS, Harvey M. et al. Common bacterial, viral, and parasitic diseases in pigeons (*Columba livia*): A review of diagnostic and treatment strategies. **Veterinary Microbiology**, v. 247, p. 108779, 2020.

52. SETIANINGRUM, Findra; RAUTEMAA-RICHARDSON, Riina; DENNING, David W. Pulmonary cryptococcosis: a review of pathobiology and clinical aspects. **Medical mycology**, v. 57, n. 2, p. 133-150, 2019.
53. SILVA, Fabrício Brito et al. Evidências de mudanças climáticas na região de transição Amazônia-Cerrado no Estado do Maranhão. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v. 31, n. 3, p. 330-336, 2016.
54. SILVA, Flávia dos Santos et al. Antifungal activity of selected plant extracts based on an ethnodirected study. **Acta Botanica Brasilica**, v. 34, p. 442-448, 2020.
55. SOARES, Betânia Maria et al. Cerebral infection caused by *Cryptococcus gattii*: a case report and antifungal susceptibility testing. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 25, n. 4, p. 242, 2008
56. TSAI, Wan-Chen et al. The clinical characteristics of adult cryptococcal meningitis patients who died within one year of treatment with a focus on those with early mortality. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 67, p. 80-84, 2019.
57. VARMA, A.; KWON-CHUNG, K. J. Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 2303-2311, 2010
58. VASCONCELOS, Ruben Horn et al. Feral pigeons (*Columba livia*) as potential reservoirs of *Salmonella* sp. and *Escherichia coli*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, p. e0412017, 2018.
59. VENA, Antonio et al. Fluconazole resistance is not a predictor of poor outcome in patients with cryptococcosis. **Mycoses**, v. 62, n. 5, p. 441-449, 2019
60. VU, Kiem; GARCIA, Javier A.; GELLI, Angie. Cryptococcal meningitis and anti-virulence therapeutic strategies. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 353, 2019.
61. XU, Lijun et al. Short-course rather than low-dose amphotericin B may exert potential influence on mortality in cryptococcal meningitis patients treated with amphotericin B plus flucytosine alone or in combination with fluconazole. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2082, 2019.
62. ZAVALA, Sofia; BADDLEY, John W. Cryptococcosis. In: **Seminars in respiratory and critical care medicine**. Thieme Medical Publishers, 2020. p. 069-07
63. ZHAO, Ting et al. Comparison of amphotericin B deoxycholate in combination with either flucytosine or fluconazole, and voriconazole plus flucytosine for the treatment of HIV-associated cryptococcal meningitis: a prospective multicenter study in China. **BMC Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, p. 677, 2022.