

**CRISTINA DE CASTRO SPADARI**

**Miltefosina como alternativa para o tratamento da criptococose: mecanismo de ação e nanopartículas de alginato como carreadores.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo  
2018

**CRISTINA DE CASTRO SPADARI**

**Miltefosina como alternativa para o tratamento da criptococose: mecanismo de ação e nanopartículas de alginato como carreadores.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Kelly Ishida

Coorientadora: Profa. Dra. Luciana B. Lopes

Versão original

São Paulo  
2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

de Castro Spadari, Cristina  
Miltefosina como alternativa para o tratamento  
da criptococose: mecanismo de ação e nanopartículas  
de alginato como carreadores. / Cristina de Castro  
Spadari; orientadora Kelly Ishida; coorientadora  
Luciana B. Lopes. -- São Paulo, 2018.  
108 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,  
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Criptococose. 2. Miltefosina. 3.  
Nanopartículas. 4. Alginato. 5. Antifúngicos. I.  
Ishida, Kelly, orientador. II. B. Lopes, Luciana,  
coorientador. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a CAPES pela concessão da bolsa de doutorado durante estes 4 anos, sem a qual seria inviável realizar a presente tese.

Muitas são as pessoas a quem agradeço pela realização deste trabalho.

Aos meus pais, que deixei com o coração apertadinho de saudade, sempre me apoiando e fazendo tudo que estava no alcance deles para me ajudar nesta etapa da vida.

À minha orientadora Prof. Dra. Kelly Ishida pela oportunidade de realizar este projeto me aceitando como sua primeira aluna da pós-graduação. Sendo sempre disponível para conversar e ajudar, me incentivando e ensinando tudo que podia.

À minha coorientadora Prof. Dra. Luciana Lopes que sempre estava disposta a me explicar sobre “minhas dúvidas de bióloga no mundo da farmacologia”.

Aos funcionários do departamento de microbiologia, em especial à Gisele por nunca me deixar perder um prazo; a Veridiana pelo auxílio nos experimentos de citometria de fluxo; ao Marco pela paciência e ajuda no Biotério; e um agradecimento especial à Zita pela ajuda nos experimentos com camundongo e, principalmente pela convivência.

Ao Prof. Dr. Carlos Taborda e seus alunos pela convivência e aprendizados, principalmente no período inicial do doutorado.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Quimioterapia Antifúngica e do Laboratório de Nanofármacos e Sistema de Liberação sempre dispostos a ajudar quando eu precisei e tornando os dias mais divertidos com conversas dos mais variados assuntos.

E não posso deixar de agradecer os presentes que o doutorado me deu para a vida: Marcelo (meu “marido”), Flavinho, Lucas, Aline (melhor IC), Ismael, Camila e Samuel. Vocês fazem minha vida mais feliz, cada um do seu jeitinho!

Aos amigos que sampa me trouxe e que tornaram esses anos melhores, em especial ao Rafael que dividiu comigo os momentos bons e ruins da vida.

Aos amigos que deixei no Rio Grande do Sul e que nunca deixaram de fazer parte da minha vida mesmo com a distância: Magali, Riotinha, Themis, Bá, Andrei e Vitor.

## **RESUMO**

SPADARI, C.C. Miltefosina como alternativa para o tratamento da criptococose: mecanismo de ação e nanopartículas de alginato como carreadores. 2018. 105 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Estudos prévios apontam que a miltefosina (MFS) pode ser uma alternativa como agente antifúngico; possui amplo espectro de ação e perfil fungicida; porém apresenta alta toxicidade. O uso de sistemas carreadores de fármacos a base de alginato tem ganhado lugar ao longo da última década. Assim, o presente trabalho visa entender os efeitos fisiológicos da MFS sobre as leveduras de *Cryptococcus* spp.; e, também, desenvolver uma formulação da MFS em nanopartículas de alginato (MFS.Alg) e posterior avaliação da eficácia antifúngica *in vitro* e em modelo murino de criptococose. Nossos resultados confirmam a atividade fungicida da MFS sobre *Cryptococcus* spp. e, também, mostram o efeito pós-antifúngico. Os efeitos fisiológicos causados nas leveduras sugerem que a MFS aumenta a permeabilidade da membrana plasmática via interação com o ergosterol, e também afeta a membrana mitocondrial, produzindo espécies reativas de oxigênio, fragmentação e condensação do DNA, levando a morte celular via apoptose. Com o intuito de reduzir os efeitos colaterais da MFS esta foi incorporada em nanopartículas de alginato (MFS.Alg), a formulação foi padronizada e caracterizada, obtendo tamanho médio de  $314,0 \pm 32,6$  nm, índice de polidispersão em torno de 0,30 e potencial zeta de  $-27,2 \pm 3,01$  mV. Além disso, essas nanopartículas incorporam  $81,7 \pm 6,64$  % do fármaco e a liberação da MFS é lenta e prolongada. A grande vantagem da MFS em nanopartículas de alginato é a redução da toxicidade quando comparado com a MFS livre. A atividade antifúngica *in vitro* da MFS.Alg é semelhante e até 10 vezes maior quando comparado ao fármaco livre. Em contraste, no modelo de criptococose sistêmica em camundongos, tanto a MFS livre como MFS.Alg aumentam a sobrevivência dos animais quando comparado com o grupo não tratado; porém, somente o tratamento com a MFS.Alg reduz a carga fúngica nos pulmões e nos cérebros. Com os dados deste trabalho conseguimos elucidar mecanismos de ação da MFS em leveduras de *Cryptococcus* e, também, propor o uso de nanopartículas de alginato com MFS incorporada como uma potencial alternativa para tratamento da criptococose.

**Palavras-chave:** Criptococose. Miltefosina. Nanopartículas. Alginato. Antifúngicos.

**ABSTRACT**

SPADARI, C.C. Miltefosine as an alternative for the treatment of cryptococcosis: action mechanism and alginate nanoparticles as carriers. 2018. 105 p. Thesis (Doctorate in Microbiology) - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo.

Previous studies indicate that miltefosine (hexadecylphosphocholine, MFS) may be an alternative as an antifungal agent once that it has broad spectrum of action and fungicide profile; however, it presents high toxicity. The use of alginate-based drug delivery systems has been gaining ground over the last decade. Thus, the present project aims to understand the physiological effects of MFS on yeasts of *Cryptococcus* spp.; and develop a formulation of MFS in alginate nanoparticles (MFS.Alg) and subsequent evaluation of the antifungal efficacy *in vitro* and in the murine model of cryptococcosis. Our results confirm the fungicidal activity of MFS on *Cryptococcus* spp. and show the post-antifungal effect. Physiological effects on yeast suggest that MFS increases plasma membrane permeability through interaction with ergosterol and affects the mitochondrial membrane, producing reactive oxygen species, DNA fragmentation and condensation, leading to cell death via apoptosis. The MFS.Alg nanoparticles were standardized and characterized, having a mean size of  $314.0 \pm 32.6$  nm, polydispersity index around 0.30 and zeta potential of  $-27.2 \pm 3.01$  mV. In addition, these nanoparticles incorporate  $81.7 \pm 6.64$  % of the drug and the release of MFS is slow and protracted. The great advantage of MFS in alginate nanoparticles is the reduction of toxicity when compared to free MFS. The *in vitro* antifungal activity of MFS.Alg is similar and up to 10 times greater when compared to the free drug. In contrast, in the systemic cryptococcosis model in mice, both free MFS and MFS.Alg increase the survival of the animals when compared to the untreated group; however, only the treatment with MFS.Alg reduces the fungal load in the lungs and in the brains. With the data of this study, we elucidated the action mechanisms of MFS in *Cryptococcus* yeasts and also proposed the use of alginate nanoparticles with incorporated MFS as a potential alternative for the treatment of cryptococcosis.

**Key words:** Cryptococcosis. Miltefosine. Nanoparticles. Alginate. Antifungals.

## 1 INTRODUÇÃO

A criptococose é uma infecção oportunista comum em pacientes com infecção avançada por HIV e, também, pode acometer pacientes imunocompetentes. A taxa de mortalidade é inaceitavelmente alta, principalmente em países de média e baixa renda. Além disso, os agentes antifúngicos disponíveis são poucos, sendo a anfotericina B e suas formulações lipídicas, fluconazol e a combinação de anfotericina B e 5-fluorocitosina as terapias indicadas para a criptococose. No entanto, o uso desses antifúngicos é limitado por problemas de toxicidade e perfis de resistência dos fungos aos antifúngicos disponíveis, além de alto custo.

Diante deste panorama, fica evidente a importância de novas terapias para o tratamento de criptococose. O processo de descoberta e desenvolvimento de medicamentos requer mais de 10 anos, em média, e a taxa de sucesso é muito baixa. Uma estratégia para novas terapias é o reposicionamento de fármacos usados em outras doenças, que tem as características farmacocinéticas e de segurança em humanos estabelecidas e vantagens em termos de custo e eficiência no tempo. A miltefosina (hexadecilfosfocolina) é um fármaco utilizado no tratamento de câncer de mama e leishmaniose visceral e cutânea. Estudos prévios apontam que a miltefosina pode ser uma alternativa como agente antifúngico, pois possui amplo espectro de ação frente a diferentes espécies fúngicas e perfil fungicida, porém apresenta alta toxicidade comparável a anfotericina B. Além disso, pouco é sabido sobre o mecanismo de ação da miltefosina em células fúngicas patogênicas.

O uso de sistemas carreadores de drogas vem sendo amplamente utilizado para melhorar o fornecimento direcionado de fármacos, solubilidade, tempo de retenção no organismo, estabilidade de fármacos lábeis, liberação controlada da droga e maior biodisponibilidade e diminuir efeitos colaterais. Adicionalmente, o alginato, um polímero natural usado em sistemas carreadores, possui características de não ser tóxico, ser biodegradável, ter baixo custo, estar prontamente disponível, ser mucoadesivo, biocompatível e uma substância não imunogênica.

Diante do exposto acima, acreditamos que a incorporação da miltefosina em sistemas carreadores de alginato possa contornar desvantagens de toxicidade e ser uma alternativa para o tratamento da criptococose. E, também, o estudo de mecanismo de ação da miltefosina em células fúngicas é um fator importante e pouco descrito na literatura.

## 2 OBJETIVOS

I - Avaliar a atividade antifúngica e os efeitos fisiológicos da miltefosina sobre leveduras de *Cryptococcus* spp.;

II - Padronizar e caracterizar nanopartículas de alginato como carreador da miltefosina; avaliar o efeito tóxico e a atividade antifúngica frente a *Cryptococcus* spp.

Com o intuito de facilitar o entendimento dos dados obtidos durante o doutorado, essa tese foi escrita em dois capítulos. O primeiro abordando o primeiro objetivo referente a atividade e mecanismo de ação da MFS sobre as leveduras de *Cryptococcus* spp., e o segundo contendo o objetivo referente a padronização, caracterização e atividade das nanopartículas de alginato com MFS incorporada.



## 3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

### 3.1 Criptococose

#### 3.1.1 Agente etiológico

*Cryptococcus* é um gênero de fungos basidiomicetos da ordem Tremellales, que são normalmente encontrados no solo (comumente contaminado com fezes de aves), árvores e madeira em decomposição (LIN; HEITMAN, 2006). Este gênero possui mais de 30 espécies distribuídas no ambiente, mas apenas 2 são comumente conhecidas por causar a criptococose em humanos: *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (MAZIARZ; PERFECT, 2016).

Historicamente, esses fungos podem ser classificados em 5 sorotipos (A, B, C, D e AD) com base em diferenças estruturais na cápsula polissacarídica. Cepas do sorotipo A, D e o híbrido AD pertencem a espécie *C. neoformans*, sendo o sorotipo A, *C. neoformans* var. *grubii* e o D, *C. neoformans* var. *neoformans*; e os sorotipos B e C pertencentes a *C. gattii* (HAGEN et al., 2015; MAZIARZ; PERFECT, 2016). Com o uso de técnicas moleculares esses fungos também foram classificados em 8 subtipos moleculares: *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) como VNI, VNII e *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo AD) como VNIII, *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) como VNIV e *C. gattii* (sorotipo B) como VGI e VGII e *C. gattii* (sorotipo C) como VGIII e VGIV (KWON-CHUNG et al., 2014; MEYER et al., 2011). Em 2015, com uso de análise filogenética de 11 locos genéticos uma nova proposta de classificação surgiu onde *C. neoformans* var. *grubii* e *C. neoformans* var. *neoformans* se tornariam espécies separadas, sendo a variedade *grubii* equivalente a *C. neoformans* e a variedade *neoformans* ao *C. deneoformans*. E a espécie *C. gattii* seria dividida em 5 espécies: *C. gattii*, *C. deuterogattii*, *C. bacillisporus*, *C. tetragattii* e *C. decagattii* (HAGEN et al., 2015). No entanto, essa proposta de classificação tem gerado discussão no meio científico onde um grupo defende a antiga classificação em 2 espécies (KWON-CHUNG et al., 2017) e o outro é a favor da nova classificação (HAGEN et al., 2017). Depois de debates, ficou recomendado o uso de “complexo *C. neoformans*” e “complexo *C. gattii*”, reconhecendo a diversidade genética sem criar confusão (KWON-CHUNG et al., 2017).

#### 3.1.2 Epidemiologia

A criptococose causada por *C. neoformans* tem distribuição mundial e a grande maioria dos pacientes com infecção sintomática disseminada são imunocomprometidos; já a infecção por *C. gattii* foi observada, inicialmente, como prevalente em regiões subtropicais e tropicais, porém estudos indicaram que a espécie se expandiu para zonas temperadas. É importante

ressaltar que a criptococose causada por *C. gattii* é significativamente menos frequente no mundo (20 %) do que a causada por *C. neoformans* (80 %) (KWON-CHUNG et al., 2014). No Brasil, infecções por *C. neoformans* estão distribuídas, porém a maioria dos casos ocorrem nas regiões Sul e Sudeste, enquanto *C. gattii* está mais relacionado com infecções endêmicas no Norte e Nordeste, ocorrendo casos esporádicos nas demais regiões (CHEN; MEYER; SORRELL, 2014; TRILLES et al., 2008)

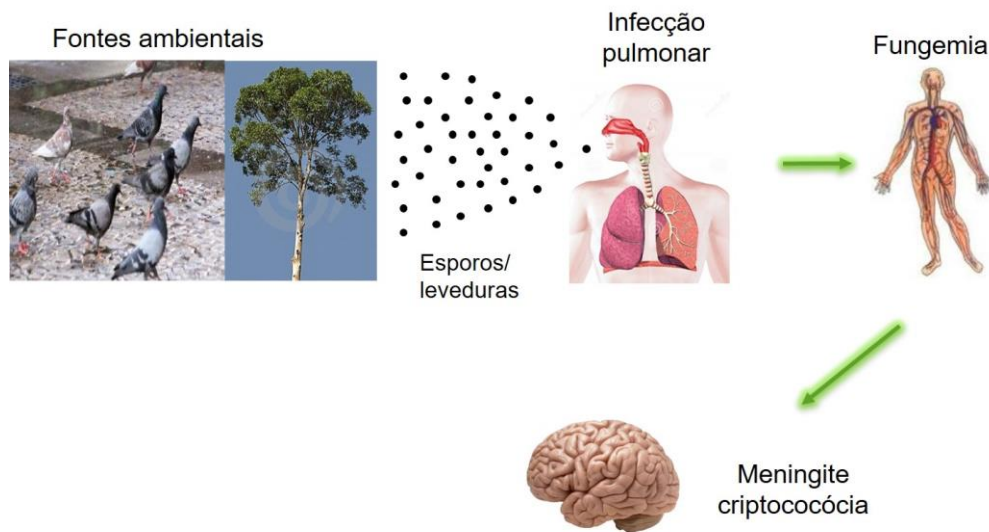
Como uma infecção oportunista comum em pacientes com infecção avançada por HIV, a criptococose é a principal causa de meningite ocorrendo ~223.100 casos/ano e mais de 81 % de mortalidade (RAJASINGHAM et al., 2017). Essas mortes ocorrem mais na África subsaariana onde a mortalidade chega a 70 % (LIMPER et al., 2017), e representa de 13 a 40 % de mortes em países com recursos limitados (ORGANIZATION WORLD HEALTH, 2011). A América Latina é a terceira região do mundo com a maioria dos casos. Nesta região, a criptococose representa a principal causa de meningite oportunista e a mortalidade continua a ser inaceitavelmente elevada (~55 %) (VIDAL et al., 2013). No Brasil, a taxa de mortalidade varia de 26 – 70 % (MEZZARI; WLIEBBELLING, 2013; MORA et al., 2012; SOUZA et al., 2013). Em estudo recente foi observado casos de criptococose em 85 % dos pacientes HIV-positivos, com taxa de 58,5 % de mortalidade mesmo com os pacientes recebendo tratamento (AGUIAR et al., 2017). Embora o aumento do acesso à terapia com antirretrovirais tenha resultado em uma redução substancial na incidência de meningite por *Cryptococcus* spp. em países de alta renda, essas infecções provavelmente se mantém como uma das principais causas de mortalidade relacionada com HIV em países de baixa e média renda, onde o tratamento antirretroviral é insuficiente/indisponível e tem início em fase avançada do HIV/AIDS (LOYSE et al., 2013).

### **3.1.3 Infecção e Patogênese**

A infecção por *Cryptococcus* ocorre pela inalação de leveduras ou esporos presentes no ambiente, podendo causar a doença pulmonar, onde a infecção pode permanecer de forma latente ou oligossintomática por um longo período. Os casos podem evoluir com disseminação hematogênica, com predileção especial pelo sistema nervoso central (SNC). Adicionalmente, pode levar a infecções envolvendo quaisquer órgãos como a pele, os ossos, os olhos, os pulmões, a próstata ou o trato urinário, sinal grave de disseminação do fungo (Figura 1) (LIN; HEITMAN, 2006; LIN, 2009; O'MEARA; ANDREW ALSPAUGH, 2012; SLOAN; PARRIS, 2014). A criptococose vem assumindo papel relevante por ser considerada uma das micoses

mais comuns em pacientes com AIDS, produzindo lesões, principalmente, no SNC (LIN; HEITMAN, 2006).

**Figura 1.** Ciclo de infecção de *Cryptococcus* spp.



O fungo sobrevive no ambiente dentro do solo (comumente contaminado com fezes de aves) e árvores. A infecção pulmonar humana ocorre pela inalação de esporos ou leveduras dessecadas presentes no ambiente. O fungo pode se reativar a partir de formas latentes e se disseminar, tendo predileção pelo sistema nervoso central (SNC) (LIN; HEITMAN, 2006).

É importante ressaltar que a espécie *C. neoformans* atinge, principalmente, os pacientes imunocomprometidos, enquanto que a espécie *C. gattii* pode, também, acometer os indivíduos imunocompetentes. *C. neoformans* causa infecção principalmente no SNC e apenas 35 % dos pacientes tem infecção pulmonar; por outro lado, *C. gattii* dissemina menos no SNC e aproximadamente 70 % dos casos de criptococose causados por *C. gattii* incluem evidência de infecção pulmonar (NGAMSKULRUNGROJ et al., 2012). Cheng e colaboradores (2009) avaliaram as respostas do hospedeiro a *C. neoformans* (H99) e *C. gattii* (R265) em modelo murino e observaram que *C. gattii* suprimiu as respostas imunes do hospedeiro de forma mais eficaz do que *C. neoformans* sugerindo explicar parcialmente por que *C. gattii* infecta pacientes imunocompetentes mais prontamente do que *C. neoformans* (CHENG; SHAM; KRONSTAD, 2009). Outro estudo observou em modelo murino de inalação que *C. neoformans* cresceu mais rapidamente no cérebro e causou morte por meningoencefalite, enquanto *C. gattii* cresceu mais rapidamente nos pulmões e causou a morte sem produzir meningoencefalite fulminante (NGAMSKULRUNGROJ et al., 2012). No entanto, quando a infecção foi realizada por inoculação intravenosa *C. gattii* produziu meningoencefalite grave, demonstrando que as leveduras podem atravessar de forma eficaz a barreira hematoencefálica. Além disso, os autores

observaram que leveduras de *C. neoformans* cresceram 10 a 100 vezes mais rápido que as de *C. gattii* no sangue ou no soro coletado e sugerem que a escassez de meningoencefalite por inalação de *C. gattii* pode ser em parte devido a um fator desconhecido do hospedeiro, juntamente com proteção imunológica que reduz a disseminação para o cérebro e promove a infecção pulmonar (NGAMSKULRUNGROJ et al., 2012).

Os pacientes com meningite criptocócica apresentam como sintomas, mais tipicamente, dor de cabeça, estado mental alterado, bem como febre, náusea e vômito. Muitos pacientes desenvolvem deterioração da visão e paralisia do nervo ótico (frequentemente devido ao aumento da pressão do líquido cefalorraquidiano). Sem tratamento a doença progride e os sintomas se estendem à confusão, convulsões, redução do nível de consciência e, eventualmente, coma (SCHWARTZ et al., 2018; WILLIAMSON et al., 2016). Muitos pacientes também tem infecção pulmonar concomitante embora, nos pacientes com HIV, isso seja frequentemente negligenciado ou diagnosticado erroneamente como tuberculose. E em pacientes sem infecção por HIV a apresentação clínica pode ser influenciada por respostas imunes do hospedeiro em particular e pelas espécies de fungo ou diferenças de linhagem. Além disso, em pacientes com HIV a duração média desde o início dos sintomas até a apresentação da doença é de 2 semanas, enquanto que em pacientes sem HIV é de 6 a 12 semanas (WILLIAMSON et al., 2016).

Além dos humanos, *Cryptococcus* spp. pode causar infecções em uma ampla gama de animais domésticos e selvagens. *C. neoformans* já foi identificado em invertebrados inferiores, como amebas, nematóides, baratas e ácaros que habitam o solo, até mamíferos superiores. Os gatos são os animais mais frequentemente infectados com o envolvimento do trato respiratório superior e inferior, granuloma subcutâneo e infecções disseminadas. Os cães podem apresentar sintomas semelhantes, mas o envolvimento do SNC é mais comum. Além disso, tem sido relatada criptococose causadora de mastite em animais leiteiros e infecções respiratórias em equinos (SEYEDMOUSAVI et al., 2018). Já *C. gattii* foi isolado de diferentes espécies de animais, incluindo gatos, cães, mamíferos marinhos, furões e lhamas nas regiões afetadas pelo surto que começou na Ilha de Vancouver e, posteriormente, se espalhou para as regiões Noroeste do Pacífico dos Estados Unidos. Infecções no trato respiratório superior e massas subcutâneas foram as lesões primárias mais frequentes, mas em vários casos o SNC, o tecido linfático, os pulmões, a cavidade oral e os olhos foram afetados. Entre os animais de estimação, observou-se um maior número de acometimento do SNC em cães, enquanto massas subcutâneas foram mais frequentes em gatos (SEYEDMOUSAVI et al., 2018).

### 3.1.4 Fatores de virulência

Dentre os principais fatores de virulência de *C. neoformans* e *C. gattii*, que contribuem para a patogênese da criptococose, destacam-se a termotolerância, os componentes da parede celular e da cápsula de mucopolissacarídeo, presença de melanina, a capacidade de adesão, a produção de enzimas como as fosfolipases, proteinases, esterases DNAses e ureases (CASADEVALL; ROSAS; NOSANCHUK, 2000; LIN; HEITMAN, 2006). Adicionalmente, a capacidade de formar biofilmes, a morfogênese e a produção de vesículas extracelulares tem sido relatadas como importantes aspectos para a patogênese e a disseminação da doença.

Tanto no ambiente como no hospedeiro infectado, *Cryptococcus* produz uma cápsula polissacarídica característica, constituída principalmente pelos açúcares glucuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM). Esta cápsula pode proteger o fungo da dessecação ambiental e/ou predadores naturais, tal como nematoides ou amebas. No hospedeiro, a cápsula tem muitas funções de proteção, incluindo a redução das respostas imunes por regulação negativa de citocinas inflamatórias, esgotando os componentes do complemento e inibição da capacidade de apresentar antígeno de monócitos. A cápsula pode também atuar como um escudo na parede da célula para regular a fagocitose pelos macrófagos. Uma vez no interior de macrófagos, a cápsula serve como um dissipador de espécies reativas de oxigênio geradas pelo hospedeiro, assim proporcionando defesas antioxidantes eficazes (O'MEARA; ANDREW ALSPAUGH, 2012). A espessura da cápsula varia de acordo com o microambiente ao seu redor, sendo que cápsulas com maior espessura contribuem mais para a sobrevivência de *Cryptococcus* no hospedeiro. Porém, linhagens acapsulares podem ser capazes de expressar virulência e causar criptococose em pacientes susceptíveis (ZARAGOZA; CASADEVALL, 2004).

O componente capsular, GXM liberado pela célula de *Cryptococcus*, é essencial para a formação de biofilme (MARTINEZ; CASADEVALL, 2005) uma característica associada com as infecções crônicas que resulta a resistência aos mecanismos imunológicos do hospedeiro (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006a) e da ação dos agentes antifúngicos (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006b). *C. neoformans* forma biofilmes em placas de poliestireno (MARTINEZ; CASADEVALL, 2005) e em materiais médicos-hospitalares, incluindo cateter de desvio arteriovenoso, fístula de diálise peritoneal, válvulas cardíacas e articulações protéticas (BANERJEE; GUPTA; VENUGOPAL, 1997; BRAUN et al., 1994; WALSH et al., 1986). O aumento do uso destes dispositivos para o controle da hipertensão intracraniana associada a meningoencefalite criptocócica realça a importância de se investigar as propriedades dos biofilmes de *Cryptococcus*. Autores têm mostrado que células do biofilme de *C. neoformans*

são menos susceptíveis ao estresse ambiental, como calor, frio e exposição aos raios UV, quando comparados com as células planctônicas (MARTINEZ; CASADEVALL, 2007). Com avanços tecnológicos, estudos mostram alterações na expressão proteica do biofilme, quando comparado com células planctônicas, como o aumento de várias proteínas relacionadas ao estresse oxidativo, adesão celular, invasão no hospedeiro e regulação de metabolismo. As proteínas envolvidas no estresse oxidativo e relacionadas à invasão tecidual foram super-reguladas, contribuindo para a resistência e dispersão do biofilme (SANTI et al., 2014).

A produção de melanina é um importante fator de virulência que confere ao patógeno resistência à fagocitose, termotolerância, proteção contra radiação ultravioleta e resistência a antifúngicos (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003). Células fúngicas melanizadas apresentam menor susceptibilidade à anfotericina B e à caspofugina, interferindo na efetividade do tratamento para criptococose (VAN DUIN; CASADEVALL; NOSANCHUK, 2002). Esses pigmentos são de cor preta ou marrom e são resultado da atividade da lacase (BORAL et al., 2018). *Cryptococcus* sintetiza a melanina quando substratos como L-DOPA, monofenol, difenol e esculina estão presentes e existe uma correlação positiva entre a atividade da lacase e a sobrevivência do fungo no líquido cefalorraquidiano humano (SABIITI et al., 2014). O cérebro é enriquecido em DOPA e, portanto, *Cryptococcus* pode usá-lo durante infecções cerebrais para se proteger de danos oxidativos (BORAL et al., 2018; LIU et al., 2008).

*Cryptococcus* spp. produz várias lipases, proteases e DNases, durante o processo de infecção, essas enzimas degradativas contribuem para a virulência, destruindo os tecidos, promovendo a sobrevivência dos fungos e interferindo na efetividade das respostas imunes do hospedeiro (ALMEIDA; WOLF; CASADEVALL, 2015). Fosfolipases e proteases auxiliam na aderência, entrada e disseminação do fungo nos tecidos do hospedeiro por lisar componentes externos das membranas celulares e degradar proteínas como colágeno, imunoglobulinas e fatores do complemento (COLEMAN et al., 2011). A urease catalisa a hidrólise de uréia em amônia, a qual por ser tóxica para células de mamíferos enfraquece a parede endotelial da barreira hematoencefálica facilitando a entrada do patógeno no SNC (ALMEIDA; WOLF; CASADEVALL, 2015; OLSZEWSKI et al., 2004).

Vesículas extracelulares foram caracterizadas em diferentes fungos, elas estão relacionadas a diversos processos biológicos das células por conter várias enzimas envolvidas em vias metabólicas como a biossíntese de aminoácidos, o metabolismo dos ácidos graxos, e outros (ZAMITH-MIRANDA et al., 2018). Em *Cryptococcus* essas vesículas também têm relação com a patogênese, sendo responsáveis por exportar o componente glucuronoxilomanana (GXM) da cápsula, muitas proteínas associadas à virulência como lacase

e urease e, também, RNA fúngico. Vesículas extracelulares mostram ter efeito sobre as células hospedeiras resultando em expressão de citosinas (TAYLOR-SMITH; MAY, 2016; ZAMITH-MIRANDA et al., 2018) e têm demonstrado aumentar a invasão criptocócica do SNC (HUANG et al., 2012). Além disso, podem ter papel na comunicação patógeno-patógeno durante a infecção (BIELSKA et al., 2018).

Outro fator importante na patogênese de *Cryptococcus* está relacionado com mudanças na morfologia das células. Normalmente a grande maioria das células encontradas durante a infecção são leveduriformes, no entanto há grande variação no tamanho dessas células. Células típicas de *C. neoformans* têm 5 a 7 µm de diâmetro, mas células de 50-100 µm podem ser encontradas *in vivo*, e são chamadas de “células titan” (TREVIJANO-CONTADOR; RUEDA; ZARAGOZA, 2016). As “células titan” são caracterizadas, além do tamanho, por serem poliploides, terem parede celular espessa e uma cápsula significativamente mais densa (MUKAREMERA et al., 2018). Essas alterações são importantes para a sobrevivência no hospedeiro pois reduzem a fagocitose, podem proliferar e produzir progênie de células virulentas de tamanho normal e essas células apresentarem reduzida suscetibilidade a fatores de estresse, fornecendo novos mecanismos para adaptação do hospedeiro e evasão imune. Além disso, as “células titan” podem sobreviver no hospedeiro por longos períodos de tempo, sem causar doença, como uma forma latente (TAYLOR-SMITH; MAY, 2016; TREVIJANO-CONTADOR; RUEDA; ZARAGOZA, 2016).

### **3.2 Antifúngicos**

Até a década dos anos 70 do século passado, os agentes antifúngicos disponíveis para terapia eram os polienos e 5-fluorocitosina (BUTTS; KRYSAN, 2012). Com o surgimento maciço de doenças fúngicas associadas à AIDS na década de 1980 e ao uso crescente de terapias médicas imunossupressoras, houve a necessidade da busca de novos agentes antifúngicos (ODDS; BROWN; GOW, 2003). Atualmente, cinco classes principais de agentes antifúngicos são comumente usadas: azóis, equinocandinas, polienos, alilaminas e análogos de pirimidinas (CAMPOY; ADRIO, 2017). No entanto, o arsenal terapêutico é limitado por problemas de seletividade, alta toxicidade e perfis de resistência dos fungos aos antifúngicos disponíveis. No caso da terapia das criptococoses, é ainda mais reduzida, sendo a anfotericina B (AMB) e suas formulações lipídicas, fluconazol (FLC) e a combinação de AMB e 5-flucitosina (5-FC), as terapias indicadas (PERFECT et al., 2010).

O tratamento da meningite criptocócica consiste em três fases: indução, consolidação e manutenção. As diretrizes da Sociedade de Doenças Infecciosas da América e da Organização

Mundial da Saúde enfatizam a importância de fármacos fungicidas potentes durante a terapia de indução, sendo o regime primário indicado a AMB (0,7–1 mg/kg/dia) e 5-FC (100 mg/kg/dia) durante 2 semanas. Como regimes alternativos quando o regime primário não está disponível é indicado uso de AMB (0,7–1 mg/kg/dia) ou suas formulações lipídicas: AMB lipossomal (3-4 mg/kg/dia) ou complexo lipídico de AMB (ABLC) (5 mg/kg/dia) durante 4 – 6 semanas; AMB (0.7–1 mg/kg/dia) e FLC (800 mg/dia) por 2 semanas; ou FLC (800–2000 mg/dia, preferencialmente 1200 mg/dia) durante 10 – 12 semanas. A fase de consolidação é realizada com uso de FLC (400 mg/dia) por 8 semanas; e a manutenção do tratamento com FLC (200 mg/dia) por 1 ano ou mais dependendo do paciente (MAZIARZ; PERFECT, 2016; PERFECT et al., 2010; SLOAN; PARRIS, 2014). Nos casos de criptococose pulmonar leve a moderada é indicado uso de fluconazol (400 mg/dia) por 6 a 12 meses; e quando a infecção é severa o paciente recebe o mesmo tratamento da meningite criptocócica (PERFECT et al., 2010).

A AMB pertence à classe dos antifúngicos poliênicos e possui um amplo espectro de ação. O primeiro mecanismo de ação descrito é a ligação da molécula de AMB ao ergosterol de membrana, induzindo a formação de poros e o sequestro de ergosterol, levando ao aumento da permeabilidade da membrana fúngica aos cátions ( $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$ ), o que promove a rápida depleção de íons intracelulares e morte celular fúngica (MESA-ARANGO; SCORZONI; ZARAGOZA, 2012; NETT; ANDES, 2016). Também foi demonstrado que o AMB causa morte das células por induzir dano oxidativo; o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) causam alterações em diferentes macromoléculas (proteínas, lipídios e DNA), causando danos celulares e morte (MESA-ARANGO; SCORZONI; ZARAGOZA, 2012; MESA-ARANGO et al., 2014). Apesar da AMB ser considerada antifúngico padrão ouro para muitas infecções, o seu uso tem sido limitado devido ao seu alto grau de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2010).

A flucitosina (5-fluorocitosina ou 5-FC) é um análogo de pirimidina que é importado para o citosol pela citosina permease fúngica e convertido em fluorouracil pela citosina desaminase. O fluorouracil prejudica a síntese de ácidos nucleicos (DNA e RNA), acabando por interferir na síntese proteica (NETT; ANDES, 2016; ODDS; BROWN; GOW, 2003). A atividade da 5-FC é limitada às leveduras patogênicas (*Candida* spp. e *Cryptococcus* spp.), mas seu uso em monoterapia não é indicado pois ocorre desenvolvimento de resistência rapidamente, frequentemente relacionada à diminuição da captação da droga pela citosina permease. Além disso, possui toxicidade para a medula óssea e toxicidade hepática (NETT; ANDES, 2016). O custo e a disponibilidade, também, são um desafio no uso da 5-FC que não



está disponível em vários países, como África (LOYSE et al., 2013) e Brasil (AGUIAR et al., 2017).

Os agentes antifúngicos azólicos são divididos em duas classes, os imidazóis (clotrimazol, cetoconazol, miconazol e outros) e triazóis (fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, isavuconazol) que são denominados de acordo com o número de átomos de nitrogênio no anel azólico. O principal efeito desses antifúngicos é inibir a 14 $\alpha$ -desmetilação do lanosterol na via biossintética do ergosterol; em que há a depleção de ergosterol na membrana citoplasmática dos fungos e o acúmulo de esteróis tóxicos (do tipo 14 $\alpha$ -metil-3,6-diol) alterando a permeabilidade e fluidez e, conseqüentemente, inibindo o crescimento fúngico (NETT; ANDES, 2016; ODDS; BROWN; GOW, 2003). O fluconazol (FLC) é utilizado para tratamento/supressão prolongada da criptococose e, em locais com poucos recursos, a monoterapia com FLC constitui o principal tratamento primário, frequentemente resultando em desenvolvimento de isolados de *Cryptococcus* de suscetibilidade reduzida ao FLC por meio de pressões seletivas (CHEONG; MCCORMACK, 2013; SMITH et al., 2015). Normalmente essa resistência ocorre por mutação no gene ERG11 (CnCYP51) resultando na substituição do aminoácido G484S na enzima alvo e conseqüente alteração da afinidade do fármaco com a enzima; também a superexpressão do gene CnAFR1, que codifica bombas de efluxo na membrana e reduz a quantidade de FLC celular diminuindo a suscetibilidade (ESPINEL-INGROFF et al., 2012).

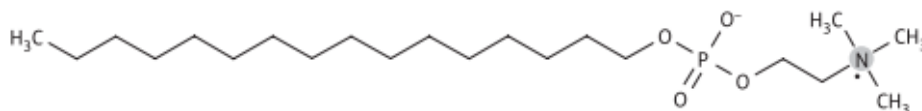
Existem pesquisas por novos compostos de origem natural ou sintética para ampliar o arsenal de agentes antifúngicos. No entanto, o reposicionamento de fármacos está se tornando um caminho cada vez mais popular na descoberta de novas terapias. Se refere ao estabelecimento de uma nova indicação para um fármaco que já tenha sido previamente aprovado para outra finalidade. O reposicionamento oferece benefícios atraentes, já que os perfis toxicológicos e farmacocinéticos foram estabelecidos anteriormente, acelerando o tempo de desenvolvimento e evitando custos substanciais associados a dispendiosos testes clínicos (TRUONG et al., 2018).

### 3.3 Miltefosina

A miltefosina (MFS) pertence à classe das alquilfosfocolinas, são ésteres de fosfocolina de álcoois alifáticos de cadeia longa (Figura 2). Sua fórmula molecular é C<sub>21</sub>H<sub>46</sub>NO<sub>4</sub>P, resultando em um peso molecular de 407,57 g/mol. A MFS é um composto anfifílico e zwitteriônico devido ao grupo amina quaternária carregada positivamente (permanentemente

carregada) e ao grupo fosfórico carregado negativamente. Além disso, é um composto cristalino e prontamente dissolúvel em solventes aquosos e orgânicos (DORLO et al., 2012a).

**Figura 2.** Fórmula estrutural da miltefosina (MFS).



Fonte: DORLO et al., 2012a

Essa molécula foi sintetizada e avaliada, na década de 80, de forma independente como potencial droga antitumoral na Alemanha e como uma droga anti-*Leishmania* no Reino Unido (CROFT; ENGEL, 2006). Foram priorizados estudos da atividade da MFS em células de câncer, o que levou a aprovação de uma formulação tópica de MFS (MilteX®) como tratamento local para metástases cutâneas de câncer de mama (CROFT; ENGEL, 2006). Como a atividade antiparasitária também foi promissora *in vitro* sobre parasitas de *Leishmania*, estudos levaram a aprovação do uso oral da MFS no tratamento de Leishmaniose visceral na Índia em 2002 (DORLO et al., 2012a). Atualmente, a MFS é efetiva em casos de leishmaniose visceral e cutânea e está aprovada, na administração por via oral, na Argentina, Bangladesh, Bolívia, Colômbia, Equador, Alemanha, Guatemala, Honduras, Índia, México, Paquistão, Paraguai e Peru; embora tenha problemas de toxicidade (CROFT; BARRETT; URBINA, 2005; PACHIONI et al., 2013; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015). No Brasil, em 2016, a MFS foi aprovada para tratamento de Leishmaniose visceral canina (Milteforan®). Além da atividade anti-*Leishmania*, estudos *in vitro* tem mostrado efeito contra outras espécies de protozoários como *Trypanosoma cruzi*, *Trichomonas vaginalis*, *Schistosoma mansoni*, *Plasmodium falciparum*, e amebas patogênicas *Entamoeba histolytica*, *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*, e *Acanthamoeba*; além de atividade antibacteriana e contra o vírus HIV (BLAHA et al., 2006; DORLO et al., 2012a; EISSA et al., 2011; PACHIONI et al., 2013; WALOCHNIK et al., 2002; WERNSDORFER et al., 2001).

Trabalhos demonstram que a MFS possui atividade antifúngica frente a diferentes gêneros de fungos (Tabela 1). Tong et al. (2007) mostraram atividade antifúngica da MFS sobre diferentes espécies de dermatófitos, enquanto Widmer et al. (2006) sobre espécies de *Candida*, *Cryptococcus* e *Aspergillus*. Em 2013, Vila et al. demonstraram a atividade inibitória sobre os biofilmes de *C. albicans*, também observando inibição sobre biofilmes de *C. albicans* e *F.*

*Oxysporum* em unhas e em biofilme causado por candidíase oral em modelo murino (VILA; QUINTANILHA; ROZENTAL, 2015; VILA et al., 2015). Recentemente, foi demonstrada a atividade antifúngica da MFS sobre *Paracoccidioides* spp., *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides posadasii*, *Sporothrix* spp., *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Scedosporium* spp. e *Pythium* spp. (BORBA-SANTOS et al., 2015; BRILHANTE et al., 2014, 2015; COMPAIN et al., 2015; IMBERT et al., 2014; ROSSI et al., 2017; LORETO et al., 2018).

**Tabela 1.** Atividade inibitória da miltefosina (MFS) sobre diferentes gêneros de fungos.

<b>Fungo</b>	<b>Faixa de CIM (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	<b>Referência</b>
<i>S. cerevisiae</i>	1 – 4	(ZUO et al., 2011)
<i>Candida albicans</i>	0,5 – 4	(RAVU et al., 2013; VILA; QUINTANILHA; ROZENTAL, 2015; VILA et al., 2013, 2015; WIDMER et al., 2006)
<i>Candida parapsilosis</i>	2 – 8	(WIDMER et al., 2006)
<i>Candida glabrata</i>	2 – 4	(RAVU et al., 2013; WIDMER et al., 2006)
<i>Candida krusei</i>	2 – 4	(RAVU et al., 2013; WIDMER et al., 2006)
<i>Candida tropicalis</i>	2 – 4	(WIDMER et al., 2006)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,25 – 4	(RAVU et al., 2013; WIDMER et al., 2006)
<i>Cryptococcus gattii</i>	0,5 – 2	(WIDMER et al., 2006)
<i>Aspergillus</i> spp.	2 – 32	(BISWAS et al., 2013a; IMBERT et al., 2014; WIDMER et al., 2006)
<i>Fusarium</i> spp.	1 – 16	(BISWAS et al., 2013a; IMBERT et al., 2014; VILA; QUINTANILHA; ROZENTAL, 2015; WIDMER et al., 2006)
<i>Scedosporium</i> spp.	2 - >32	(BISWAS et al., 2013a; COMPAIN et al., 2015; IMBERT et al., 2014; WIDMER et al., 2006)
<i>Bipolaris australiensis</i>	2 – 4	(WIDMER et al., 2006)
<i>Exophiala</i> spp.	2 – 4	(WIDMER et al., 2006)
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	2 – 4	(WIDMER et al., 2006)
<i>Absidia corymbifera</i>	2 – 16	(BISWAS et al., 2013a; WIDMER et al., 2006)
<i>Rhizopus</i> spp.	2 – 64	(WIDMER et al., 2006)

<i>Cunninghamella bertholletia</i>	2 – 4	(WIDMER et al., 2006)
<i>Mucor</i> spp.	8	(BISWAS et al., 2013a)
<i>Rhizomucor</i> sp.	2	(BISWAS et al., 2013a)
<i>Trichophyton</i> spp.	0,25 – 2	(TONG et al., 2007)
<i>Microsporium</i> spp.	0,25 – 2	(TONG et al., 2007)
<i>Sporothrix brasiliensis</i>	0,5 – 2	(BORBA-SANTOS et al., 2015; BRILHANTE et al., 2014)
<i>Sporothrix schenckii</i>	1 – 2	(BRILHANTE et al., 2014)
<i>Sporothrix mexicana</i>	1 – 4	(BRILHANTE et al., 2014)
<i>Sporothrix globosa</i>	2 – 4	(BRILHANTE et al., 2014)
<i>Histoplasma capsulatum</i> (micélio)	0,25 – 4	(BRILHANTE et al., 2014)
<i>Histoplasma capsulatum</i> (levedura)	0,125 – 2	(BRILHANTE et al., 2014)
<i>Coccidioides posadasii</i> (micélio)	1 – 4	(BRILHANTE et al., 2015)
<i>Paracoccidioides</i> spp.	0,12 – 1	(ROSSI et al., 2017)
<i>Pythium</i> spp.	0,5 – 4	(LORETO et al., 2018)

Em células tumorais a MFS atua inibindo a proteína kinase C e a biossíntese de fosfatidilcolina e esfingomielina, mas o mecanismo de ação sobre os parasitas de *Leishmania* spp. ainda não está totalmente elucidado. Alguns estudos mostram que a miltefosina altera o metabolismo de lipídios e a composição das membranas de *Leishmania* spp., causa perturbação na homeostase de  $Ca^{2+}$ , causa morte celular pelo processo de apoptose (via citocromo c mitocondrial e fragmentação do DNA) e, também, apresenta efeito imunomodulador no hospedeiro (DORLO et al., 2012a; PINTO-MARTINEZ et al., 2018).

Em fungos, poucos estudos de mecanismo de ação da MFS têm sido realizados. Widmer et al. (2006) demonstraram ação inibitória da MFS sobre a fosfolipase B1 (PLB1) por ser uma substância análoga aos substratos dessa enzima e um importante fator de virulência de *C. neoformans*. Em 2014, Biswas e colaboradores, demonstraram que o efeito fungicida em *Sacharomyces cerevisiae* é causado pela quebra do potencial de membrana da mitocôndria e morte celular por apoptose via subunidade Cox9p do citocromo oxidase c (COX). Recentemente, grupos de pesquisa tem observado o rompimento da membrana plasmática de leveduras de *Sporothrix brasiliensis* (BORBA-SANTOS et al., 2015) e de *Paracoccidioides* spp. (ROSSI et al., 2017); e inibição da síntese do ergosterol em *C. posadasii* e *H. capsulatum* (BRILHANTE et al., 2015). Além disso, estudos observaram a presença de grânulos de

melanina em leveduras de *S. brasiliensis* (BORBA-SANTOS et al., 2015) e *Paracoccidioides* spp. (ROSSI et al., 2017) após a exposição com concentrações sub-inibitórias de MFS, sugerindo que esteja interferindo no metabolismo da melanina. MFS, de modo geral, apresenta amplo espectro de atividade e efeito fungicida; e desta forma, poucos estudos sobre mecanismos de resistência têm sido realizados. Entretanto, uma cepa de *S. cerevisiae* super-expressora de transportador de hexoses (gene HXT13) apresentou menor sensibilidade a MFS (BISWAS et al., 2013b).

Poucos estudos sobre a atividade antifúngica da MFS em modelos experimentais de infecção fúngica tem sido realizados. Widmer et al. (2006) demonstraram atividade *in vivo* em modelo de criptococose disseminada (infecção pela veia caudal e início do tratamento oral após 1,5 h da infecção) em doses efetivas de 7,2 e 3,6 mg/Kg/dia, mostrando aumento da sobrevivência e redução da carga fúngica nos pulmões e redução da disseminação do fungo para o SNC quando comparado com grupo controle infectado não tratado. Por outro lado, Wiederhold et al., (2013) avaliaram a atividade da MFS em modelo murino de criptococose disseminada e de meningoencefalite criptocócica obtida por infecção diretamente no cérebro; entretanto, este fármaco não foi capaz de reduzir significativamente a mortalidade dos camundongos e a carga fúngica no cérebro (início do tratamento após 1 dia após a infecção). É sabido que a absorção pelo trato gastrointestinal da miltefosina é baixa (taxa de 0,36 h<sup>2</sup>) e que se liga às proteínas plasmáticas do soro (96-98 %), o que pode explicar, em parte, a falta de atividade *in vivo* observada neste estudo por haver apenas uma pequena fração da droga disponível no organismo para agir no local da infecção (DORLO et al., 2012a; WIEDERHOLD et al., 2013). Além disso, ainda permanece desconhecido se a MFS consegue passar pela barreira hematoencefálica (DORLO et al., 2012a), o que seria mais uma característica impeditiva no controle, principalmente, da meningoencefalite.

Apesar de a MFS ser o fármaco de escolha para tratamento das leishmanioses, câncer de mama e muitos trabalhos tem demonstrado atividade antifúngica contra diferentes espécies; essa droga apresenta algumas desvantagens farmacocinéticas (como descritas em parágrafo anterior) e de toxicidade que pode dificultar a sua utilização. A elevada toxicidade como os efeitos gastrointestinais (náuseas, vômito, diarreia) estão relacionados com a administração oral da MFS e das propriedades detergente da droga que afetam a mucosa gastrointestinal. Outras toxicidades relacionadas com MFS, frequentemente, observadas estão associadas principalmente com os rins e o fígado. Níveis séricos elevados de creatinina e de ambas enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartatoaminotransferase (AST) tendem a aumentar nas primeiras semanas de tratamento. Adicionalmente, observa-se efeito teratogênico

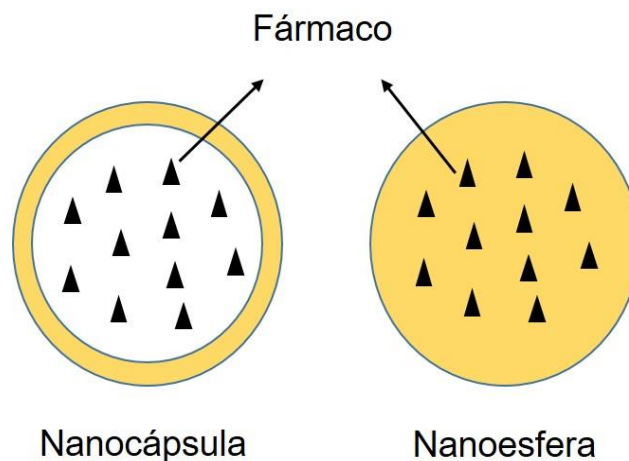
e elevada atividade hemolítica (similar a anfotericina B deoxicolato) (revisado por DORLO et al., 2012a).

### **3.4 Sistemas carreadores de fármacos**

O interesse em formulações farmacêuticas, onde a liberação do fármaco pode ser controlada, vem aumentando constantemente nos últimos 50 anos. Na maioria dos casos o objetivo é criar um produto que mantenha um efeito terapêutico prolongado em uma frequência de dosagem reduzida (TØNNESEN; KARLSEN, 2002). Vários sistemas carreadores de fármacos têm sido empregados na pesquisa de liberação de fármacos para melhorar o fornecimento direcionado de medicamentos, solubilidade, tempo de retenção no organismo, estabilidade de fármacos lábeis, liberação controlada do fármaco e maior biodisponibilidade devido ao fato de que sistemas carreadores na faixa nanométrica são eficientes em atravessar barreiras biológicas além de minimizar efeitos adversos, incluindo riscos de toxicidade (JEEVANANDAM; CHAN; DANQUAH, 2016; KUMAR et al., 2013; PANDEY et al., 2005).

Existem diferentes tipos de sistemas de liberação como dendrímeros, nanopartículas, lipossomas, nanoemulsões e micelas (JEEVANANDAM; CHAN; DANQUAH, 2016). As nanopartículas, por definição geral, variam em tamanho de 10 a 1000 nm e o fármaco é dissolvido, aprisionado, encapsulado ou ligado a uma matriz (HAMIDI; AZADI; RAFIEI, 2008). Essas por sua vez, podem ser nanocápsulas ou nanoesferas; nanocápsulas são sistemas vesiculares nos quais o fármaco está confinado a um núcleo líquido oleoso ou aquoso circundado por uma membrana polimérica, enquanto que as nanoesferas são partículas esféricas com um interior de matriz no qual o componente aprisionado é fisicamente disperso (PAQUES et al., 2014; SAHOO; LABHASETWAR, 2003) (Figura 3).

**Figura 3.** Representação de nanocápsulas e nanoesferas.



Fonte: modificado de SAHOO; LABHASETWAR, (2003)

Os sistemas baseados em polímeros têm atraído atenção significativa, pois oferecem diversas vantagens em relação as outras plataformas, principalmente devido à enorme versatilidade das matrizes poliméricas, que permite a adaptação das propriedades do transportador para atender à necessidade específica pretendida. Outras vantagens dos sistemas poliméricos incluem facilidade de produção, alta eficiência de encapsulação da molécula de interesse, proteção do fármaco contra degradação físico-química, flexibilidade de suas propriedades físico-químicas (como tamanho, carga superficial e hidrofobicidade), degradação lenta ou rápida do polímero e erosão do polímero em resposta a estímulos para controle temporal sobre a liberação dos fármacos (SPADARI; LOPES; ISHIDA, 2017; VOLTAN et al., 2016).

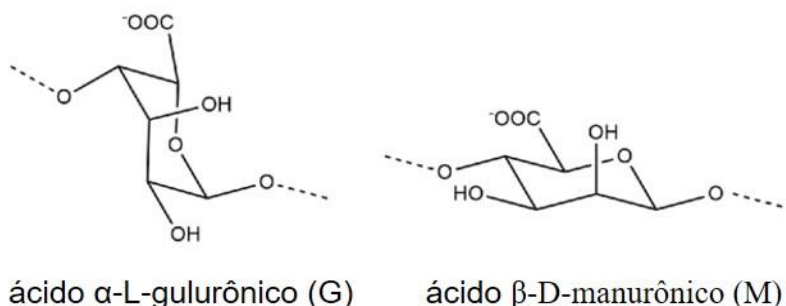
As nanopartículas poliméricas podem ser preparadas com polímeros sintéticos como o ácido polilático (PLA) (TYLER et al., 2016), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) (THOMAS et al., 2016), óxido de polietileno (PEG), poli(acetato de vinila) (PVA) (LI et al., 2015a); muitos polímeros naturais estão também sendo amplamente utilizados como alginato (ELSAIED; HUANG; EDIRISINGHE, 2015), quitosana (ISLAM; FERRO, 2016), gelatina (MAHOR et al., 2016) e dextran (GALLOVIC et al., 2016). Os polímeros naturais são vantajosos em comparação com os polímeros sintéticos devido à sua abundância na natureza, baixo custo de processamento, biocompatibilidade, biodegradabilidade, solubilidade em água, bioatividade e segurança ambiental (DEBELE; MEKURIA; TSAI, 2016; SUNDAR; KUNDU;

KUNDU, 2010). Outra vantagem é que a estrutura dos polímeros naturais pode ser modificada para alcançar o efeito desejado (PAHUJA; ARORA; PAWAR, 2012).

### 3.5 Alginato

O interesse da comunidade científica pelo alginato para uso em sistemas de liberação de fármacos tem crescido ao longo da última década (SOSNIK, 2014). Ele é um polímero aniônico produzido por bactérias e algas marrons, constituído de ácidos  $\alpha$ -L-gulurônico (G) e  $\beta$ -D-manurônico (M) com os resíduos linearmente ligados por ligações 1,4-glicosídicas (Figura 4) e exibindo homosequências de cadeia de MMMMM e GGGGG, interdispersas com heterosequências de MGMGMG (SOSNIK, 2014; SPADARI; LOPES; ISHIDA, 2017). O peso molecular é na faixa de 32-400 kg/mol, e variações na proporção e arranjos em cadeia dos blocos M e G podem ser encontrados dependendo do tipo de alga marinha da qual o alginato foi extraído (CARDOSO; COSTA; MANO, 2016; SOSNIK, 2014).

**Figura 4.** Estrutura molecular dos ácidos  $\alpha$ -L-gulurônico (G) e  $\beta$ -D-manurônico (M) do polímero de alginato.



Fonte: SPADARI; LOPES; ISHIDA, 2017.

A extração do alginato de algas marrons é realizada com auxílio de soluções aquosas alcalinas, normalmente hidróxido de sódio, onde o alginato natural é convertido em alginato de sódio solúvel em água; esse extrato é filtrado e adicionado cloreto de sódio ou de cálcio para precipitar o alginato. Após purificação e conversões adicionais, o pó de alginato de sódio solúvel em água é produzido (LEE; MOONEY, 2012; QIN, 2008). Em peso seco, os teores de alginato obtidos são de 22 – 30 % para *Ascophyllum nodosum*, 25 – 44 % para *Laminaria digitata*, e 17 - 33 e 25 – 30 % para as frondes e caules, respectivamente, de *Laminaria hyperborea* (QIN, 2008). Outra fonte de alginato são bactérias *Azotobacter* e *Pseudomonas* que possuem a rota biosintética para produção desse polímero; no entanto, mesmo sob condições



otimizadas de fermentação, os rendimentos de produção são bastante baixos (em torno de 4 g/L) e o processo não é considerado economicamente viável para aplicações comerciais (REMMINGHORST; REHM, 2006).

O alginato tem importantes características como não ser tóxico, ser biodegradável, ter baixo custo, estar prontamente disponível, ser mucoadesivo, biocompatível e uma substância não imunogênica (HOSSEINI et al., 2013; PAQUES et al., 2014). Outro fator importante é a habilidade desse polímero de formar estruturas tridimensionais quando em contato com cátions divalentes; esse mecanismo de gelificação é explicado pelo modelo “egg-box”, no qual um cátion divalente interage com 4 grupos carboxilas (-COOH) formando a estrutura tridimensional, podendo ser incorporado o fármaco desejado no interior dessa estrutura (SOSNIK, 2014). As partículas de alginato oferecem a flexibilidade de serem administradas por várias vias, incluindo a via oral, que continua a ser a mais indicada (PANDEY; KHULLER, 2004a, 2004b). Também, são bem absorvidas pelas mucosas (MARTÍN et al., 2015; MARTÍN-VILLENA et al., 2013) e possuem boa distribuição em vários órgãos, incluindo o sistema nervoso central (CHENG et al., 2012; HAQUE et al., 2014).

Além disso, agentes antifúngicos (azóis e polienos) têm sido incorporados em sistemas carreadores baseados em alginato, incluindo nanopartículas, micropartículas, hidrogéis, comprimidos e filmes, com grande sucesso mostrando resultados promissores *in vitro* e *in vivo* para atividade antifúngica, redução da toxicidade e da dose total do antifúngico usado no tratamento e melhor biodisponibilidade (Tabela 2) (SPADARI; LOPES; ISHIDA, 2017). Por exemplo, micropartículas de alginato contendo anfotericina B apresentaram melhor atividade no tratamento de candidíase sistêmica quando comparadas com o fármaco livre e, também, uma redução na dose total de medicamento utilizado para o tratamento (SANGEETHA et al., 2007). Econazol em micropartículas de alginato mucoadesivas foram efetivas inibindo o crescimento de *C. albicans*, sugerindo um efeito benéfico no tratamento de candidíase vulvovaginal com potencial redução na frequência de administração de doses (ALBERTINI et al., 2009). Martin et al. (2015) desenvolveram microesferas de alginato como transportadores de nistatina na mucosa oral para tratamento de candidíase oral e observaram ótimas propriedades mucoadesivas e efetiva atividade antifúngica.

**Tabela 2.** Sistemas carreadores de fármacos à base de alginato para agentes antifúngicos, azóis e polienos.

<b>Antifúngico</b>	<b>Carreador</b>	<b>Objetivo terapêutico</b>	<b>Modelo experimental</b>	<b>Referência</b>
Clotrimazol	Nanopartículas de alginato	Melhorar a biodisponibilidade	<i>In vivo</i> (rato)	(PANDEY et al., 2005)
	Filmes de alginato, hidroxipropilcelulose e propilenoglicol	Tratamento de candidíase vaginal	<i>In vitro</i>	(MISHRA; JOSHI; MEHTA, 2016)
Econazol	Nanopartículas de alginato	Melhorar a biodisponibilidade	<i>In vivo</i> (rato)	(PANDEY et al., 2005)
	Nanopartículas de alginato	Potencial quimioterapêutico contra a tuberculose	<i>In vivo</i> (rato)	(AHMAD; SHARMA; KHULLER, 2007)
Miconazol	Tabletes de alginato	Liberação lenta bucal	<i>In vitro e in vivo</i> (voluntário humano)	(MOHAMMED; KHEDR, 2003)
Fluconazol	Filmes de alginato e álcool polivinílico	Overcome the problems of high drug dose requirement and toxicity	<i>In vitro e ex vivo</i>	(PATEL; SHAH; TIWARI, 2015)
	Microesferas de etilcelulose com fase interna de alginato	Atividade contra <i>C. albicans</i>	<i>In vitro</i>	(MAITI et al., 2009)
	Filmes e discos mucoadesivos de alginato	Tratamento tópico para candidíase oral	<i>In vitro e in vivo</i> (voluntário humano)	(YEHIA; EL-GAZAYERLY; BASALIOUS, 2008, 2009)
Voriconazol	Gel de alginato	Medicamento ocular contra <i>C. albicans</i> e <i>Asperigillus fumigatus</i>	<i>In vitro</i>	(PAWAR; EDGAR, 2012)
Anfotericina B	Nanoesferas de alginato	Tratamento de candidíase sistêmica	<i>In vitro e in vivo</i> (rato)	(SANGEETHA et al., 2007)
	Nanopartículas de alginato glycol e quitosana	Melhorar tratamento de leishmaniose visceral	<i>In vitro e in vivo</i> (hamster)	(GUPTA et al., 2015)
	Filmes de alginato	Tratamento de candidíase oral	<i>In vitro</i>	(COSSU et al., 2015)
	Anfotericina B lipídica revestida com alginato	Tratamento de leishmaniose visceral	<i>In vitro</i>	(SINGODIA et al., 2011)
Nistatina	“beads”, micro- e nanopartículas de alginato incorporados em creme dental	Tratamento de candidíase oral	<i>In vitro</i>	(REIS et al., 2015)
	Microesferas e hidrogel de alginato	Tratamento de candidíase oral	<i>In vitro e in vivo</i> (porco)	(MARTÍN et al., 2015)
	Micropartículas de alginato	Tratamento de candidíase vaginal	<i>In vitro e ex vivo</i>	(MARTÍN-VILLENA et al., 2013)

Fonte: SPADARI; LOPES; ISHIDA, 2017

## 4 CAPÍTULO I

### **Objetivo geral:**

Avaliar a atividade antifúngica e os efeitos fisiológicos da miltefosina sobre leveduras de *Cryptococcus* spp.

### **Objetivos específicos:**

- Avaliar a atividade antifúngica da miltefosina sobre células planctônicas e de biofilme de *Cryptococcus* spp.;
- Analisar o efeito pós-antifúngico da miltefosina sobre as leveduras *Cryptococcus* spp.;
- Avaliar os efeitos morfológicos e fisiológicos da MFS sobre as leveduras de *Cryptococcus* spp.

Este capítulo gerou o artigo “Miltefosine has post-antifungal effect and induces apoptosis in *Cryptococcus* yeasts” Submetido em 14 de fevereiro de 2018 e aceito para publicação em 18 de maio de 2018 na revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*

Autores: Cristina de Castro Spadari, Taissa Vila, Sonia Rozental, Kelly Ishida.

#### 4.4 Conclusão

- A MFS possui alto potencial como agente antifúngico contra a criptococose, devido aos baixos valores de concentração inibitória mínima em células planctônicas (CIM-P) tanto para isolados ATCC quanto clínicos de *Cryptococcus* spp. Além de atividade inibitória sobre as células em dispersão do biofilme;

- Os valores de PAFE demonstram que a MFS possui atividade inibitória sobre *Cryptococcus* spp. mesmo depois da retirada do fármaco após uma breve exposição;

- A MFS causa várias mudanças nas leveduras de *Cryptococcus* spp. como a redução da espessura da cápsula; aumento da permeabilidade da membrana; danos nas mitocôndrias e consequente aumento de ROS e fragmentação e condensação de DNA, levando a morte do fungo por apoptose.

## 5 CAPÍTULO II

### **Objetivo geral:**

Padronizar e caracterizar nanopartículas de alginato como carreador da miltefosina; avaliar o efeito tóxico e a atividade antifúngica frente a *Cryptococcus* spp.

### **Objetivos específicos:**

- Padronizar a produção de nanopartículas de alginato com miltefosina;
- Caracterizar as nanopartículas de alginato com miltefosina por métodos microscópicos e físico-químicos;
- Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* das nanopartículas de alginato com miltefosina sobre células planctônicas de *Cryptococcus* spp.;
- Analisar o efeito antifúngico *in vivo* das nanopartículas de alginato com miltefosina em modelo murino de criptococose.

Parte dos dados deste capítulo gerou o depósito do pedido de patente no INPI sob nº: BR102017018011-5, data: 23/08/2017; título “Formulação farmacêutica, processo para preparação da formulação farmacêutica, e uso da mesma”.

Inventores: Kelly Ishida, Cristina de Castro Spadari, Luciana Biagini Lopes, Fernanda Walt Mendes da Silva de Bastiani

## 5.4 Conclusão

- O protocolo de produção das nanopartículas de alginato foi padronizado utilizando o método de emulsificação com gelificação externa, e obtidas nanopartículas com tamanho médio de  $314,0 \pm 32,6$  nm, índice de polidispersão em torno de 0,30 e potencial zeta de  $-27,2 \pm 3,01$  mV, com superfície regular e formas esféricas e/ou poliédricas irregulares;

- A porcentagem de incorporação da miltefosina nas nanopartículas de alginato é de  $81,7\% \pm 6,64$  e ocorre uma liberação lenta e prolongada do fármaco quando avaliado *in vitro*;

- Nanopartículas MFS.Alg avaliadas *in vitro* sobre células planctônicas de *Cryptococcus* spp. mostraram atividade antifúngica com valores de CIM semelhantes e até ~10 x mais altos que a MFS livre;

- O uso de nanopartículas de alginato como carreador da MFS não causou hemólise, diminuindo a toxicidade quando comparado com o fármaco livre;

- As nanopartículas de alginato com miltefosina (MFS.Alg) mostraram atividade contra criptococose sistêmica, aumentando a sobrevivência dos camundongos infectados e diminuindo a carga fúngica no pulmão e cérebro.

## REFERÊNCIAS

- ABDELWAHED, W. et al. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 15, p. 1688–1713, 30 dez. 2006.
- AGUIAR, P. A. D. F. DE et al. The epidemiology of cryptococcosis and the characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated in a Brazilian University Hospital. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, n. February 2016, 2017.
- AHMAD, Z.; SHARMA, S.; KHULLER, G. K. Chemotherapeutic evaluation of alginate nanoparticle-encapsulated azole antifungal and antitubercular drugs against murine tuberculosis. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, n. 3, p. 239–243, 2007.
- ALBERTINI, B. et al. Polymer-lipid based mucoadhesive microspheres prepared by spray-congealing for the vaginal delivery of econazole nitrate. **European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 4-5, p. 591–601, 2 mar. 2009.
- ALMEIDA, F.; WOLF, J. M.; CASADEVALL, A. **Virulence-associated enzymes of *Cryptococcus neoformans****Eukaryotic Cell*, 2015.
- ARAUJO, G. DE S. et al. Capsules from Pathogenic and Non-Pathogenic *Cryptococcus* spp. Manifest Significant Differences in Structure and Ability to Protect against Phagocytic Cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. e29561, 12 jan. 2012.
- BANERJEE, U.; GUPTA, K.; VENUGOPAL, P. A case of prosthetic valve endocarditis caused by *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. **Journal of medical and veterinary mycology : bi-monthly publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 35, n. 2, p. 139–41, 1997.
- BARRATT, G.; SAINT-PIERRE-CHAZALET, M.; LOISEAU, P. Cellular Transport and Lipid Interactions of Miltefosine. **Current Drug Metabolism**, v. 10, n. 3, p. 247–255, 1 mar. 2009.
- BIELSKA, E. et al. Pathogen-derived extracellular vesicles mediate virulence in the fatal human pathogen *Cryptococcus gattii*. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1556, 19 dez. 2018.
- BISWAS, C. et al. In vitro activity of miltefosine as a single agent and in combination with voriconazole or posaconazole against uncommon filamentous fungal pathogens. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 12, p. 2842–2846, 2013a.
- BISWAS, C. et al. Functional characterization of the hexose transporter Hxt13p: An efflux pump that mediates resistance to miltefosine in yeast. **Fungal Genetics and Biology**, v. 61, p. 23–32, 2013b.
- BISWAS, C. et al. Functional disruption of yeast metacaspase, Mca1, leads to miltefosine

resistance and inability to mediate miltefosine-induced apoptotic effects. **Fungal Genetics and Biology**, v. 67, p. 71–81, 2014.

BITTERCOURT, J. J. G. et al. Miltefosine-loaded lipid nanoparticles: improving stability and reducing hemolytic potential to erythrocytes and cytotoxic effect to macrophages. **Biophysical chemistry**, v. submetido, p. 20–31, 2016.

BLAHA, C. et al. In vitro activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against metronidazole-resistant and -susceptible strains of *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. December 2005, p. 273–278, 2006.

BOJARCZUK, A. et al. *Cryptococcus neoformans* Intracellular Proliferation and Capsule Size Determines Early Macrophage Control of Infection. **Scientific Reports**, v. 6, n. October 2015, p. 21489, 2016.

BORAL, H. et al. Overview of selected virulence attributes in *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton rubrum*, and *Exophiala dermatitidis*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 111, p. 92–107, 2018.

BORBA-SANTOS, L. P. et al. Miltefosine is active against *Sporothrix brasiliensis* isolates with in vitro low susceptibility to amphotericin B or itraconazole. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 415–422, 2015.

BRAUN, D. K. et al. Cryptococcal Infection of a Prosthetic Dialysis Fistula. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 24, n. 5, p. 864–867, 1 nov. 1994.

BRILHANTE, R. S. N. et al. In vitro inhibitory effect of miltefosine against strains of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* and *Sporothrix* spp. **Medical Mycology**, v. 52, n. 3, p. 320–325, 2014.

BRILHANTE, R. S. N. et al. In vitro antifungal activity of miltefosine and levamisole: their impact on ergosterol biosynthesis and cell permeability of dimorphic fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 4, p. 962–969, out. 2015.

BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; LEVITZ, S. M. Tackling Human Fungal Infections. **Science**, v. 336, n. 6082, p. 647–647, 11 maio 2012.

BUTTS, A.; KRYSAN, D. J. Antifungal Drug Discovery: Something Old and Something New. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 9, p. 9–11, 2012.

CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 86–96, 2017.

CARDOSO, M.; COSTA, R.; MANO, J. Marine Origin Polysaccharides in Drug Delivery Systems. **Marine Drugs**, v. 14, n. 2, p. 34, 5 fev. 2016.

CASADEVALL, A.; ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D. **Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*** *Current Opinion in Microbiology*, 2000.

CEGNAR, M.; MIKLAVŽIN, A.; KERČ, J. Freeze-drying and release characteristics of polyelectrolyte nanocarriers for the mucosal delivery of ovalbumin. **Acta Chimica Slovenica**,



v. 58, n. 2, p. 241–250, 2011.

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

CHENG, P. Y.; SHAM, A.; KRONSTAD, J. W. Cryptococcus gattii isolates from the British Columbia cryptococcosis outbreak induce less protective inflammation in a murine model of infection than Cryptococcus neoformans. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 10, p. 4284–4294, out. 2009.

CHENG, Y. et al. Alginic acid nanoparticles prepared through counterion complexation method as a drug delivery system. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 4, n. 10, p. 5325–5332, 2012.

CHEONG, J. W. S.; MCCORMACK, J. Fluconazole resistance in cryptococcal disease: emerging or intrinsic? **Medical Mycology**, v. 51, n. 3, p. 261–269, 1 abr. 2013.

CHITKARA, D. et al. Core-shell nanoparticulate formulation of gemcitabine: lyophilization, stability studies, and in vivo evaluation. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 4, n. 5-6, p. 439–451, 2014.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard - third edition. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, n. April, p. 1–25, 2008.

COLEMAN, J. J. et al. Cryptococcus neoformans: Nonvertebrate Hosts and the Emergence of Virulence. In: **Cryptococcus**. [s.l.] American Society of Microbiology, 2011. p. 261–267.

COMPAIN, F. et al. In vitro activity of miltefosine in combination with voriconazole or amphotericin B against clinical isolates of Scedosporium spp. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. Pt\_3, p. 309–311, 2015.

COSSU, A. et al. Antifungal activity against Candida albicans of starch Pickering emulsion with thymol or amphotericin B in suspension and calcium alginate films. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 493, n. 1-2, p. 233–242, 2015.

CROFT, S. L.; BARRETT, M. P.; URBINA, J. A. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 11, p. 508–512, 2005.

CROFT, S. L.; ENGEL, J. Miltefosine--discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 100 Suppl , p. S4–8, 2006.

DE AGUIAR CORDEIRO, R. et al. Synthesis and antifungal activity in vitro of isoniazid derivatives against histoplasma capsulatum var. capsulatum. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 2504–11, 2014.

DEBELE, T. A.; MEKURIA, S. L.; TSAI, H.-C. Polysaccharide based nanogels in the drug delivery system: Application as the carrier of pharmaceutical agents. **Materials Science and Engineering: C**, 2016.

DORLO, T. P. C. et al. Miltefosine: A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in

the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. July, p. 2576–2597, 2012a.

DORLO, T. P. C. et al. Characterization and identification of suspected counterfeit miltefosine capsules. **The Analyst**, v. 137, p. 1265, 2012b.

EISSA, M. M. et al. Miltefosine, a promising novel agent for schistosomiasis mansoni. **International journal for parasitology**, v. 41, n. 2, p. 235–42, 2011.

EISSA, M. M. et al. Miltefosine Lipid Nanocapsules for Single Dose Oral Treatment of Schistosomiasis Mansoni: A Preclinical Study. **Plos One**, v. 10, n. 11, p. e0141788, 2015.

EL-MOSLEMANY, R. M. et al. Miltefosine lipid nanocapsules: Intersection of drug repurposing and nanotechnology for single dose oral treatment of pre-patent schistosomiasis mansoni. **Acta Tropica**, v. 159, p. 142–148, jul. 2016.

ELSAYED, M.; HUANG, J.; EDIRISINGHE, M. Bioinspired preparation of alginate nanoparticles using microbubble bursting. **Materials Science and Engineering C**, v. 46, p. 132–139, 2015.

ERNST, E. J.; KLEPSE, M. E.; PFALLER, M. A. Postantifungal effects of echinocandin, azole, and polyene antifungal agents against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 4, p. 1108–11, abr. 2000.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex: An international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 11, p. 5898–5906, nov. 2012.

GALLOVIC, M. D. et al. Acetalated Dextran Microparticulate Vaccine Formulated via Coaxial Electrospray Preserves Toxin Neutralization and Enhances Murine Survival Following Inhalational *Bacillus Anthracis* Exposure. **Advanced Healthcare Materials**, p. 1–11, 2016.

GUERRA, C. R. et al. Terbinafine inhibits *Cryptococcus neoformans* growth and modulates fungal morphology. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 5, p. 582–590, 2012.

GUPTA, P. K. et al. Self Assembled Ionically Sodium Alginate Cross-Linked Amphotericin B Encapsulated Glycol Chitosan Stearate Nanoparticles: Applicability in Better Chemotherapy and Non-Toxic Delivery in Visceral Leishmaniasis. **Pharmaceutical Research**, v. 32, n. 5, p. 1727–1740, 2015.

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

HAGEN, F. et al. Importance of Resolving Fungal Nomenclature: the Case of Multiple Pathogenic Species in the *Cryptococcus* Genus. **mSphere**, v. 2, n. 4, p. e00238–17, 30 ago. 2017.

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Advanced**

**Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 15, p. 1638–1649, 2008.

HAQUE, S. et al. Development and evaluation of brain targeted intranasal alginate nanoparticles for treatment of depression. **Journal of Psychiatric Research**, v. 48, n. 1, p. 1–12, 2014.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 265 – 273, 9 maio 2013.

HOSSEINI, S. M. et al. Incorporation of essential oil in alginate microparticles by multiple emulsion/ionic gelation process. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 582–588, 2013.

HUANG, S. H. et al. Cryptococcus neoformans-Derived Microvesicles Enhance the Pathogenesis of Fungal Brain Infection. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 2012.

IMBERT, S. et al. In vitro combination of voriconazole and miltefosine against clinically relevant molds. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 11, p. 6996–6998, 2014.

ISHIDA, K. et al. Influence of tannins from Stryphnodendron adstringens on growth and virulence factors of Candida albicans. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 942–949, 6 set. 2006.

ISHIDA, K. et al. Activity of tannins from Stryphnodendron adstringens on Cryptococcus neoformans: effects on growth, capsule size and pigmentation. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 8, p. 29, 2009.

ISLAM, N.; FERRO, V. Recent Advances in Chitosan-Based Nanoparticulate Pulmonary Drug Delivery. **Nanoscale**, 2016.

JAIN, K. K. **Drug Delivery System**. New York, NY: Springer New York, 2014. v. 1141

JEEVANANDAM, J.; CHAN, Y. S.; DANQUAH, M. K. Nano-formulations of drugs: Recent developments, impact and challenges. **Biochimie**, v. 128-129, p. 99–112, 2016.

JIAO, Y. In Vitro and In Vivo Evaluation of Oral Heparin-Loaded Polymeric Nanoparticles in Rabbits. **Circulation**, v. 105, n. 2, p. 230–235, 15 jan. 2002.

KATHIRAVAN, M. K. et al. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 19, p. 5678–5698, 2012.

KHAN, A. A. et al. Antifungal efficacy of amphotericin B encapsulated fibrin microsphere for treating Cryptococcus neoformans infection in Swiss albino mice. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n. 4, p. 342–348, 2016.

KUMAR, A. et al. Innovative pharmaceutical development based on unique properties of nanoscale delivery formulation. **Nanoscale**, v. 5, n. 18, p. 8307, 2013.

KUMAR, R. et al. Development of PLGA–PEG encapsulated miltefosine based drug delivery system against visceral leishmaniasis. **Materials Science and Engineering: C**, v. 59, p. 748–

753, fev. 2016.

KUMAR, S. N.; MOHANDAS, C. An antifungal mechanism of protolichestherinic acid from the lichen *Usnea albopunctata* lies in the accumulation of intracellular ROS and mitochondria-mediated cell death due to apoptosis in *Candida tropicalis*. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. MAY, p. 1–18, 2017.

KWON-CHUNG, K. J. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. **Cold Spring Harb Perspect Med**, p. 1–28, 2014.

KWON-CHUNG, K. J. et al. The Case for Adopting the “Species Complex” Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. **mSphere**, v. 2, n. 1, p. e00357–16, 22 fev. 2017.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 37, n. 1, p. 106–126, 2012.

LI, L. et al. Applications of natural polymeric materials in solid oral modified-release dosage forms. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, n. 40, p. 5854–5867, 2015a.

LI, S. P. et al. The fruiting body and its caterpillar host of *Cordyceps sinensis* show close resemblance in main constituents and anti-oxidation activity. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 9, n. 4, p. 319–324, jan. 2002.

LI, Y. et al. Diorcinol D Exerts Fungicidal Action against *Candida albicans* through Cytoplasm Membrane Destruction and ROS Accumulation. **Plos One**, v. 10, n. 6, p. e0128693, 2015b.

LIMPER, A. H. et al. Fungal infections 1 Fungal infections in HIV/AIDS. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3099, n. 17, p. 1–10, 2017.

LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: Morphogenesis, infection, and evolution. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 4, p. 401–416, 2009.

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

LIU, O. W. et al. Systematic Genetic Analysis of Virulence in the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Cell**, v. 135, n. 1, p. 174–188, 3 out. 2008.

LOPES, M. et al. Probing insulin bioactivity in oral nanoparticles produced by ultrasonication-assisted emulsification/internal gelation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 5865, set. 2015.

LORETO, E. S. et al. In vitro activities of miltefosine and antibacterial agents from the macrolide, oxazolidinone, and pleuromutilin classes against *pythium insidiosum* and *pythium aphanidermatum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 3, p. 1–13, 2018.

LOYSE, A. et al. Cryptococcal meningitis: improving access to essential antifungal medicines in resource-poor countries. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 7, p. 629–637, jul. 2013.

LUDOVICO, P.; CÔRTE-REAL, M.; SANSONETTY, F. Assessment of mitochondrial membrane potential in yeast cell populations by flow cytometry. **Microbiology**, v. 147, n. 12,

p. 3335–3343, 2001.

LUIZ, R. L. F. et al. Proanthocyanidins polymeric tannin from *Stryphnodendron adstringens* are active against *Candida albicans* biofilms. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 68, 19 dez. 2015.

MAHBUBUL, I. M. et al. Effective ultrasonication process for better colloidal dispersion of nanofluid. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 26, p. 361–369, set. 2015.

MAHOR, A. et al. Moxifloxacin loaded gelatin nanoparticles for ocular delivery: Formulation and in-vitro, in-vivo evaluation. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 483, p. 132–138, 2016.

MAITI, S. et al. Investigation on processing variables for the preparation of fluconazole-loaded ethyl cellulose microspheres by modified multiple emulsion technique. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 3, p. 703–15, 2009.

MARTÍN, M. J. et al. Development of alginate microspheres as nystatin carriers for oral mucosa drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 140–149, 2015.

MARTINEZ, L. R. et al. The use of chitosan to damage *Cryptococcus neoformans* biofilms. **Biomaterials**, v. 31, n. 4, p. 669–679, 2010.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Specific Antibody Can Prevent Fungal Biofilm Formation and This Effect Correlates with Protective Efficacy. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 10, p. 6350–6362, 2005.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* cells in biofilms are less susceptible than planktonic cells to antimicrobial molecules produced by the innate immune system. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 11, p. 6118–6123, 2006a.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* Biofilms to Antifungal Agents In Vitro Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* Biofilms to Antifungal Agents In Vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 3, p. 1021–1033, 2006b.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold, and UV light. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 14, p. 4592–4601, 2007.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Bio fi lm Formation by *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology spectrum**, v. 3, n. 3, p. 1–11, 2015.

MARTÍN-VILLENA, M. J. et al. Novel microparticulate systems for the vaginal delivery of nystatin: Development and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 1–11, 2013.

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

- MENDES DE TOLEDO, C. E. et al. Antifungal Properties of Crude Extracts, Fractions, and Purified Compounds from Bark of *Curatella americana* L. (Dilleniaceae) against *Candida* Species. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1–9, 2015.
- MESA-ARANGO, A. C. et al. The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 11, p. 6627–6638, 2014.
- MESA-ARANGO, A. C.; SCORZONI, L.; ZARAGOZA, O. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. AUG, p. 286, 2012.
- MEYER, W. et al. Molecular Typing of the *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* Species Complex. In: **Cryptococcus**. [s.l.] American Society of Microbiology, 2011. p. 327–357.
- MEZZARI, A.; WLIBBELLING, A. Criptococose Em Um Hospital Público De Porto Alegre. **Journal of Infection ...**, v. 2, n. 3, p. 135–139, 2013.
- MISHRA, R.; JOSHI, P.; MEHTA, T. Formulation, development and characterization of mucoadhesive film for treatment of vaginal candidiasis. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 6, n. 1, p. 47, 2016.
- MOHAMMED, F. A.; KHEDR, H. Preparation and In Vitro/In Vivo Evaluation of the Buccal Bioadhesive Properties of Slow-Release Tablets Containing Miconazole Nitrate. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 29, n. 3, p. 321–337, 2003.
- MORA, D. J. et al. Clinical, Epidemiological and Outcome Features of Patients with Cryptococcosis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Mycopathologia**, v. 173, n. 5-6, p. 321–327, 1 jun. 2012.
- MUKAREMERA, L. et al. Titan cell production in *Cryptococcus neoformans* reshapes the cell wall and capsule composition during infection. **The Cell Surface**, v. 1, n. August 2017, p. 15–24, 2018.
- MUNOZ, A. J. et al. Systems biology of yeast cell death. **FEMS Yeast Research**, v. 12, n. 2, p. 249–265, 2012.
- NETT, J. E.; ANDES, D. R. Antifungal Agents. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 51–83, mar. 2016.
- NGAMSKULRUNGROJ, P. et al. The Primary Target Organ of *Cryptococcus gattii* Is Different from That of *Cryptococcus neoformans* in a Murine Model. **mBio**, v. 3, n. 3, p. e00103–12–e00103–12, 2012.
- NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Budding of melanized *Cryptococcus neoformans* in the presence or absence of L-dopa. **Microbiology**, v. 149, n. 7, p. 1945–1951, 1 jul. 2003.
- NOUDEH, G. D. et al. Determination of the toxicity effect of sorbitan esters surfactants group

- on biological membrane. **Journal of Biological Sciences**, v. 9, n. 5, p. 423–430, 2009.
- O'MEARA, T. R.; ANDREW ALSPAUGH, J. The *Cryptococcus neoformans* capsule: A sword and a shield. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 3, p. 387–408, 2012.
- ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal agents: Mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 272–279, 2003.
- OLSZEWSKI, M. A. et al. Urease Expression by *Cryptococcus neoformans* Promotes Microvascular Sequestration, Thereby Enhancing Central Nervous System Invasion. **American Journal of Pathology**, v. 164, n. 5, p. 1761–1771, 2004.
- ORGANIZATION WORLD HEALTH. Rapid advice: diagnosis, prevention and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children: December 2011. **Geneva: World Health Organization**, n. December, 2011.
- OSTROSKY-ZEICHNER, L. et al. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 9, p. 719–727, 20 set. 2010.
- PACHIONI, J. D. A. et al. Alkylphospholipids - A promising class of chemotherapeutic agents with a broad pharmacological spectrum. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 5, p. 742–759, 2013.
- PAHUJA, P.; ARORA, S.; PAWAR, P. Ocular drug delivery system: a reference to natural polymers. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 9, n. 7, p. 837–861, 2012.
- PANDEY, R. et al. Nano-encapsulation of azole antifungals: Potential applications to improve oral drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 301, p. 268–276, 2005.
- PANDEY, R.; KHULLER, G. K. Subcutaneous nanoparticle-based antitubercular chemotherapy in an experimental model. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 266–268, 2004a.
- PANDEY, R.; KHULLER, G. K. Polymer based drug delivery systems for mycobacterial infections. **Current drug delivery**, v. 1, n. 3, p. 195–201, jul. 2004b.
- PANYAM, J.; LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 3, p. 329–347, 24 fev. 2003.
- PAQUES, J. P. et al. Alginate submicron beads prepared through w/o emulsification and gelation with CaCl<sub>2</sub> nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 31, n. 2, p. 428–434, 2013.
- PAQUES, J. P. et al. Preparation methods of alginate nanoparticles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 209, p. 163–171, 2014.
- PARENTE-ROCHA, J. A. et al. Antifungal Resistance, Metabolic Routes as Drug Targets, and New Antifungal Agents: An Overview about Endemic Dimorphic Fungi. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, p. 1–16, 2017.
- PASPARAKIS, G.; BOUROPOULOS, N. Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate-chitosan beads. **International Journal of**

**Pharmaceutics**, v. 323, n. 1-2, p. 34–42, 2006.

PATEL, S. K.; SHAH, D. R.; TIWARI, S. Bioadhesive films containing fluconazole for mucocutaneous candidiasis. **Indian journal of pharmaceutical sciences**, v. 77, n. 1, p. 55–61, 2015.

PATIL, S. et al. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. **Biomaterials**, v. 28, n. 31, p. 4600–4607, 2007.

PAWAR, S. N.; EDGAR, K. J. Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. **Biomaterials**, v. 33, n. 11, p. 3279–3305, abr. 2012.

PEREIRA DE SÁ, N. et al. Thiazole compounds with activity against *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* in vitro. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 102, p. 233–242, 2015.

PERFECT, J. R. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 50, n. 3, p. 291–322, 2010.

PFALLER, M. A.; SHEEHAN, D. J.; REX, J. H. Determination of Fungicidal Activities against Yeasts and Molds: Lessons Learned from Bactericidal Testing and the Need for Standardization. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 2, p. 268–280, 2004.

PINTO-MARTINEZ, A. K. et al. Mechanism of action of miltefosine on *Leishmania donovani* involves the impairment of acidocalcisome function and the activation of the sphingosine-dependent plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-channel. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 1, p. 1–10, 2018.

QIN, Y. Alginate fibers: an overview of the production processes and applications in wound management. **Polymer international**, v. 57, n. April, p. 171–180, 2008.

RAJASINGHAM, R. et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. 873–881, ago. 2017.

RAVU, R. R. et al. Synthesis and antifungal activities of miltefosine analogs. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 17, p. 4828–4831, 2013.

REIS, C. P. et al. Innovative formulation of nystatin particulate systems in toothpaste for candidiasis treatment. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 7450, n. April, p. 1–6, 2015.

REMMINGHORST, U.; REHM, B. H. A. Bacterial alginates: From biosynthesis to applications. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 21, p. 1701–1712, 2006.

ROSSI, D. C. P. et al. Miltefosine is fungicidal to *Paracoccidioides* spp. yeast cells but subinhibitory concentrations induce melanisation. **International Journal of Antimicrobial**



**Agents**, v. 49, n. 4, p. 465–471, abr. 2017.

SABIITI, W. et al. Efficient phagocytosis and laccase activity affect the outcome of HIV-associated cryptococcosis. **The Journal of clinical investigation**, v. 124, n. 5, p. 2000–8, maio 2014.

SAHOO, S. K.; LABHASETWAR, V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 24, p. 1112–1120, 15 dez. 2003.

SALDANHA, C. A. et al. Antifungal Activity of Amphotericin B Conjugated to Nanosized Magnetite in the Treatment of Paracoccidioidomycosis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 6, p. e0004754, 15 jun. 2016.

SANGEETHA, S. et al. Formulation of Sodium Alginate Nanospheres Containing Amphotericin B for the Treatment of Systemic Candidiasis. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 6, n. March, p. 653–659, 2007.

SANTI, L. et al. Proteomic profile of *Cryptococcus neoformans* biofilm reveals changes in metabolic processes. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 3, p. 1545–1559, 2014.

SANTOS, J. R. A. et al. Fluconazole alters the polysaccharide capsule of *cryptococcus gattii* and leads to distinct behaviors in murine cryptococcosis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1–14, 2014.

SCHWARTZ, S. et al. Advances in the diagnosis and treatment of fungal infections of the CNS. **The Lancet Neurology**, v. 17, n. 4, p. 362–372, 2018.

SEYEDMOUSAVI, S. et al. Fungal infections in animals: A patchwork of different situations. **Medical Mycology**, v. 56, n. May, p. S165–S187, 2018.

SILVA, J. D. F. DA et al. MICROEMULSIONS: COMPONENTS, CHARACTERISTICS, POTENTIALITIES IN FOOD CHEMISTRY AND OTHER APPLICATIONS. **Química Nova**, v. 38, n. 8, p. 1196–1206, 2015.

SINGODIA, D. et al. Development and performance evaluation of alginate-capped amphotericin B lipid nanoconstructs against visceral leishmaniasis. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 7, n. 1, p. 123–124, 2011.

SLOAN, D. J.; PARRIS, V. Cryptococcal meningitis: Epidemiology and therapeutic options. **Clinical Epidemiology**, v. 6, n. 1, p. 169–182, 2014.

SMITH, K. D. et al. Increased antifungal drug resistance in clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* in Uganda. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7197–7204, dez. 2015.

SOSNIK, A. Alginate Particles as Platform for Drug Delivery by the Oral Route: State-of-the-Art. **ISRN Pharmaceutics**, v. 2014, p. 1–17, 2014.

SOUZA, L. K. H. E et al. Clinical and microbiological features of cryptococcal meningitis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 3, p. 343–347, jun. 2013.

SPADARI, C. DE C.; LOPES, L. B.; ISHIDA, K. Potential Use of Alginate-Based Carriers As

- Antifungal Delivery System. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. January, p. 1–11, 30 jan. 2017.
- SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 16, n. 2, p. 237–252, 22 jan. 2015.
- SUNDAR, S.; KUNDU, J.; KUNDU, S. C. Biopolymeric nanoparticles. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 11, n. 1, p. 014104, 12 fev. 2010.
- TACHAPRUTINUN, A.; PAN-IN, P.; WANICHWECHARUNGRUANG, S. Mucosa-plate for direct evaluation of mucoadhesion of drug carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 441, n. 1-2, p. 801–808, 2013.
- TAN, T. R. M. et al. Characterization of a polyethylene glycol-amphotericin B conjugate loaded with free AMB for improved antifungal efficacy. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. e0152112, 23 mar. 2016.
- TAUROZZI, J. S.; HACKLEY, V. A.; WIESNER, M. R. **Preparation of Nanoparticle Dispersions from Powdered Material Using Ultrasonic Disruption - Version 1.1**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://nvlpubs.nist.gov/nistpubs/SpecialPublications/NIST.SP.1200-2.pdf>>.
- TAYLOR-SMITH, L. M.; MAY, R. C. New weapons in the Cryptococcus infection toolkit. **Current Opinion in Microbiology**, v. 34, n. Figure 1, p. 67–74, 2016.
- THOMAS, N. et al. Efficacy of Poly-Lactic-Co-Glycolic Acid Micro- and Nanoparticles of Ciprofloxacin Against Bacterial Biofilms. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 10, p. 3115–3122, ago. 2016.
- TONG, Z. et al. In vitro activities of miltefosine and two novel antifungal biscationic salts against a panel of 77 dermatophytes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 6, p. 2219–2222, 2007.
- TØNNESEN, H. H.; KARLSEN, J. Alginate in Drug Delivery Systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 28, n. 6, p. 621–630, 17 jan. 2002.
- TREVIJANO-CONTADOR, N. et al. Capsule Enlargement in *Cryptococcus neoformans* Is Dependent on Mitochondrial Activity. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. July, p. 1–11, 2017.
- TREVIJANO-CONTADOR, N.; RUEDA, C.; ZARAGOZA, O. Fungal morphogenetic changes inside the mammalian host. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 57, p. 100–109, 2016.
- TRILLES, L. et al. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 455–462, 2008.
- TRUONG, M. et al. Repurposing drugs to fast-track therapeutic agents for the treatment of cryptococcosis. **PeerJ**, v. 6, p. e4761, 4 maio 2018.
- TSUBAMOTO, H. et al. Repurposing itraconazole as an anticancer agent. **Oncology Letters**, v. 14, n. 2, p. 1240–1246, ago. 2017.

TYLER, B. et al. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 107, p. 163–175, 15 dez. 2016.

UCHIDA, K.; ABE, S.; YAMAGUCHI, H. The postantifungal effect (PAFE) of itraconazole, in comparison with those of miconazole and fluconazole, on *Candida* Species. **Microbiology and immunology**, v. 50, n. 9, p. 679–85, 2006.

VAN DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3394–3400, nov. 2002.

VIDAL, J. E. et al. Review article Strategies to reduce mortality and morbidity due to AIDS-related cryptococcal meningitis in Latin America. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 353–362, 2013.

VILA, T. et al. Miltefosine inhibits *Candida albicans* and non-*albicans Candida* spp. biofilms and impairs the dispersion of infectious cells. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 5, p. 512–520, 2016.

VILA, T. V. M. et al. Effect of alkylphospholipids on *Candida albicans* biofilm formation and maturation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 1, p. 113–125, 2013.

VILA, T. V. M. et al. In Vitro Activity of Miltefosine against *Candida albicans* under Planktonic and Biofilm Growth Conditions and In Vivo Efficacy in a Murine Model of Oral Candidiasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7611–7620, dez. 2015.

VILA, T. V. M.; QUINTANILHA, N. S.; ROZENTAL, S. Miltefosine is effective against *Candida albicans* and *Fusarium oxysporum* nail biofilms in vitro. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 11, p. 1436–1449, 2015.

VILA, T. V. M.; ROZENTAL, S. Biofilm Formation as a Pathogenicity Factor of Medically Important Fungi. In: **Fungal Pathogenicity**. [s.l.] InTech, 2016. p. 1–24.

VOLTAN, A. R. et al. Fungal diseases : could nanostructured drug delivery systems be a novel paradigm for therapy ? **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 3715–3730, 2016.

WALOCHNIK, J. et al. Cytotoxic Activities of Alkylphosphocholines against Clinical Isolates of *Acanthamoeba* spp . **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 695–701, 2002.

WALSH, T. J. et al. Ventriculoatrial shunt infection due to *Cryptococcus neoformans*: An ultrastructural and quantitative microbiological study. **Neurosurgery**, v. 18, n. 3, p. 373–375, mar. 1986.

WERNSDORFER, W. H. et al. Effects of Miltefosine and Other Alkylphosphocholines on Human Intestinal Parasite *Entamoeba histolytica*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 5, p. 1505–1510, 2001.

WIDMER, F. et al. Hexadecylphosphocholine (miltefosine) has broad-spectrum fungicidal activity and is efficacious in a mouse model of cryptococcosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 2, p. 414–421, 2006.

WIEDERHOLD, N. P. et al. Limited activity of miltefosine in murine models of cryptococcal meningoencephalitis and disseminated cryptococcosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 2, p. 745–750, 2013.

WILHELM, C. et al. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. **Biomaterials**, v. 24, n. 6, p. 1001–1011, 2003.

WILLIAMSON, P. R. et al. Cryptococcal meningitis: epidemiology, immunology, diagnosis and therapy. **Nature Publishing Group**, 2016.

YAO, H. et al. Preparation and evaluation of a novel gastric floating alginate/poloxamer inner-porous beads using foam solution. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 422, n. 1-2, p. 211–219, 2012.

YEHIA, S. A; EL-GAZAYERLY, O. N.; BASALIOUS, E. B. Design and in vitro/in vivo evaluation of novel mucoadhesive buccal discs of an antifungal drug: relationship between swelling, erosion, and drug release. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 4, p. 1207–1217, 2008.

YEHIA, S. A; EL-GAZAYERLY, O. N.; BASALIOUS, E. B. Fluconazole mucoadhesive buccal films: in vitro/in vivo performance. **Current drug delivery**, v. 6, n. 1, p. 17–27, 2009.

ZAMITH-MIRANDA, D. et al. Fungal extracellular vesicles: modulating host–pathogen interactions by both the fungus and the host. **Microbes and Infection**, 2018.

ZARAGOZA, O.; CASADEVALL, A. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. **Biological Procedures Online**, v. 6, n. 1, p. 10–15, jan. 2004.

ZUO, X. et al. Miltefosine Induces Apoptosis-Like Cell Death in Yeast via Cox9p in Cytochrome c Oxidase. **Molecular pharmacology**, v. 80, p. 476–485, 2011.