

UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO
INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA
CENTRO UNIVERSITÁRIO ESTADUAL DA ZONA OESTE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA
TRANSLACIONAL

RENATA NASCIMENTO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE NANOPARTÍCULAS DE
PRATA/CLORETO DE PRATA DE ORIGEM BIOLÓGICA EM *Cryptococcus* spp.**

DUQUE DE CAXIAS

2020

RENATA NASCIMENTO DA SILVA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA/CLORETO DE PRATA DE ORIGEM BIOLÓGICA EM *Cryptococcus* spp.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa Interinstitucional de Biomedicina Translacional - BIOTRANS, Universidade do Grande Rio - UNIGRANRIO, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, INMETRO, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste - UEZO, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biomedicina.

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Orientador: Dr. Celso Sant'Anna de Barbosa Filho

DUQUE DE CAXIAS

2020

RENATA NASCIMENTO DA SILVA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA/CLORETO DE PRATA DE ORIGEM BIOLÓGICA EM *Cryptococcus* spp.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa Interinstitucional de Biomedicina Translacional - BIOTRANS, Universidade do Grande Rio - UNIGRANRIO, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, INMETRO, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste - UEZO, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biomedicina.

Aprovado em ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Celso Sant'Anna de Barbosa Filho (Presidente)
INMETRO/BIOTRANS

Dr. Marcel Menezes Lyra Da Cunha
UFRJ

Dra. Sara Gemini Piperni
UNIGRANRIO/BIOTRANS

Dr. Leonardo da Cunha Boldrini Pereira
INMETRO/BIOTRANS

Dra. Emile Santos Barrias (Suplente)
INMETRO

SUMÁRIO

1. Introdução	10
1.1 Nanotecnologia	10
1.1.1 Nanobiotecnologia	11
1.2 Nanopartículas	11
1.2.1 Nanopartículas Metálicas	12
1.2.2 Nanopartículas de Prata	13
1.2.3 Nanopartículas de Prata/Cloreto de Prata	14
1.2.4 Síntese de Nanopartículas	15
1.3 Aplicações Biomédicas de Nanopartículas	16
1.4 O gênero <i>Cryptococcus</i> spp.	17
1.5 Criptococose	18
1.6 Fatores de Virulência	19
1.6.1 Cápsula	20
1.7 Ciclo de infecção de <i>Cryptococcus</i>	22
1.8 Tratamento e Resistência a drogas	24

1.9	
2. Justificativa	23
3. Objetivos.....	24
3.1 Objetivo Geral	24
3.2 Objetivos Específicos.....	24
4. Materiais e Métodos	25
4.1 Cepas utilizadas e condições de cultivo das Leveduras.....	25
4.2 Nanopartículas de Prata/Cloreto de Prata (Ag/AgCl-NPs)	25
4.3 Avaliação do efeito antiproliferativo de Ag/AgCl-NPs em <i>Cryptococcus spp</i>	25
4.5 Ensaio de Viabilidade celular	26
4.5 Coloração Nanquim – Microscopia Óptica de Campo Claro	26
4.7 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	26
4.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	27
4.8 Determinação do IC ₅₀	27
4.9 Análises Estatísticas.....	28
5. Resultados	28
5.1 Avaliação do efeito antiproliferativo de Ag/AgCl-NPs em <i>Cryptococcus spp.</i>	28
5.2 Ensaio de Viabilidade celular	31
5.3 Coloração Nanquim – Microscopia Óptica de Campo Claro	34
5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	37
5.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	41
6. Discussão	42
7. Referências Bibliográficas	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- AgCl-NPs: Nanopartículas de Cloreto de Prata
- Ag/AgCl-NPs: Nanopartículas de Prata/Cloreto de Prata
- AgNPs: Nanopartículas de Prata
- AIDS: Doença do sistema imunológico humano causada pelo vírus HIV
- AuNPs: Nanopartículas de Ouro
- BSE: Elétrons Secundários
- DNA: Ácido Desoxirribonucleico
- DO: Densidade Óptica
- HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana
- IC₅₀: Concentração que inibe em 50% o crescimento/viabilidade das células
- MC: Meningite Criptocócica
- MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão
- MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura
- MIC: Concentração inibitória mínima
- NPs: Nanopartículas
- NPMs: Nanopartículas Metálicas
- OMS: Organização Mundial da Saúde
- RNA: Ácido ribonucleico
- ROS: Espécies Reativas de Oxigênio
- RPSL: Ressonância Plasmônica de Superfície
- SEI: Elétrons Retroespalhados
- SNC: Sistema Nervoso Central

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me fazer superar todas as dificuldades que encontrei no caminho e ter me permitido chegar até aqui.

Aos meus pais, Hugo e Lili e aos meus irmãos, Vitor e Diego, por serem meus maiores incentivadores.

Ao meu orientador, Celso, por ter me recebido em seu grupo de pesquisa. Por me incentivar, me ensinar e por estar sempre disponível quando preciso.

Aos meus colegas de laboratório, em especial à Veronica por ter me ensinado toda parte experimental quando entrei no laboratório, sua ajuda foi essencial para mim. Ao Flávio que me auxiliou na preparação de amostras; ao Yuri que me ajudou com a microscopia; à Chayenne por ser minha dupla nas disciplinas e por me ajudar com a estatística, ao Matheus pelas nanopartículas; à Michelle, Thais e Renato pelas contribuições e parceria.

Agradeço a Dra. Susana Frases por ceder as leveduras usadas neste trabalho e por ter me recebido em seu laboratório. Agradeço também ao Glauber por ter me ensinado seu protocolo.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite de participar da defesa e enriquecer este trabalho.

À CAPES, CNPq e FAPERJ pelo suporte financeiro.

RESUMO

O uso de nanopartículas metálicas está entre as estratégias mais promissoras para superar a resistência a antimicrobianos, visto que, diferente dos antifúngicos convencionais essas NPs atuam nos micro-organismos através de múltiplos alvos, tornando mínima ou improvável a chance de ocorrer resistência antimicrobiana. As cápsulas microbianas são consideradas como um fator importante para a virulência de *Cryptococcus* spp., mas sua arquitetura e propriedades físicas são pouco compreendidas. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho é avaliar o potencial antifúngico de Ag/AgCl- NPs, analisando o efeito da interação entre as Ag/AgCl-NPs e leveduras do gênero *Cryptococcus* spp. Leveduras da espécie *C. gattii*, *C. liquefaciens* e *C. neoformans* foram tratadas com concentrações entre 0 e 125 µg/mL de Ag/AgCl-NPs, em meio mínimo e em meio Sabouraud. O ensaio antiproliferativo mostrou que os tratamentos com as Ag/AgCl-NPs foram dose-dependentes, possuindo efeito inibitório significativo a partir de 1 µg/mL em meio mínimo para as espécies em 3 dias. Em meio sabouraud, a inibição do crescimento ocorreu a partir de 10 µg/mL para *C. liquefaciens*, 5 µg/mL *C. gattii*, e a partir de 25 µg/mL para *C. neoformans*. A diminuição da viabilidade celular em meio mínimo ocorreu em todas as concentrações para as 3 espécies. Já em meio sabouraud, a viabilidade foi afetada a partir de 75 µg/mL para *C. liquefaciens*, a partir de 5 µg/mL para *C. gattii*, e a partir de 50 µg/mL para *C. neoformans*. Análises de Microscopia de campo claro com células contrastadas com Nanquim mostraram um aumento de 19,15% na cápsula de *C. gattii* e uma redução de 28,07 e 28,43% para *C. liquefaciens* e *C. neoformans*, respectivamente, em meio mínimo; de modo oposto, em meio Sabouraud observamos uma aparente redução de 53,1% da cápsula de *C. gattii*, enquanto as espécies *C. liquefaciens* e *C. neoformans* apresentaram o aumento de 19,78 e 19,55% da cápsula polissacarídica. As imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) revelaram que as NPs não estavam presentes na cápsula das leveduras, e nem todas as superfícies das células estavam marcadas. Por fim, as imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) mostraram que uma grande quantidade de aglomerados de NPs atingiram tanto o interior como a parte exterior das leveduras. Os dados obtidos neste trabalho confirmam o excelente desempenho antifúngico de NPs à base de prata, que podem ser explorados para novos tratamentos de infecções fúngicas, necessitando dessa forma de mais estudos para compreender o mecanismo pelo qual as NPs conseguem interagir com *Cryptococcus* spp.

Palavras-chave: nanomedicina, nanopartículas, efeito antimicrobiano, criptococose, cápsula polissacarídica, microscopia.

ABSTRACT

The use of metallic nanoparticles is among the most promising strategies to overcome resistance to antimicrobials. Unlike conventional antifungals these NPs act on microorganisms through multiple targets making the chance of antimicrobial resistance minimal or unlikely. Microbial capsules are considered an important factor for the virulence of *Cryptococcus* spp. but their architecture and physical properties are poorly understood. In this context, the purpose of this work is to evaluate the antifungal potential of Ag/AgCl-NPs analyzing the effect of the interaction between Ag/AgCl-NPs and yeasts of the genus *Cryptococcus* spp. Yeasts of the species *C. gattii*, *C. liquefaciens* and *C. neoformans* were treated with concentrations between 0 and 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Ag/AgCl-NPs in minimal medium and in Sabouraud medium. The antiproliferative assay showed that the treatments with Ag/AgCl-NPs were dose-dependent with a significant inhibitory effect from 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in minimum medium for the species in 3 days. In sabouraud medium growth inhibition occurred from 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *C. liquefaciens* and *C. gattii*, and from 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *C. neoformans*. The decrease in cell viability in minimal medium occurred in all concentrations for the 3 species. In a sabouraud environment viability was affected from 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *C. liquefaciens* from 5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ for *C. gattii*, and from 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ for *C. neoformans*. Optical microscopy analysis with cells stained with India ink showed an increase of 19.15% in the *C. gattii* capsule and a reduction of 28.07 and 28.43% for *C. liquefaciens* and *C. neformans* respectively in minimal means; in Sabouraud medium we observed an apparent reduction of 53.1% in the *C. gattii* capsule, while the species *C. liquefaciens* and *C. neoformans* showed an increase of 19.78 and 19.55% in the polysaccharide capsule. Scanning Electron Microscopy (SEM) images revealed that nanoparticles were not present in the yeast capsule, and not all cell surfaces were marked. Finally, Transmission Electron Microscopy (TEM) images showed that a large number of NPs clusters reached both the inside and the outside of the yeasts. The data obtained in this work confirm the excellent antifungal performance of silver-based nanoparticles which can be explored for new treatments for fungal infections thus requiring further studies to understand the mechanism by which NPs can interact with *Cryptococcus* spp.

Keywords: nanomedicine, nanoparticles, antimicrobial effect, cryptococcosis, polysaccharide capsule, microscopy.

1. Introdução

1.1 Nanotecnologia

A nanotecnologia é a ciência que estuda o controle da matéria em escala molecular e atômica. Geralmente, a nanotecnologia está relacionada com estruturas de tamanho entre 1-100 nanômetros com pelo menos uma dimensão e envolve a modificação ou o desenvolvimento de materiais dentro desse tamanho (KAUR *et.al*, 2016). De acordo com a National Science Foundation, a nanotecnologia é a capacidade de compreender, controlar e manipular a matéria ao nível de átomos e moléculas individuais. Em 1959, o físico Richard Feynman sugeriu a manipulação dos átomos como forma de construir novos materiais, em uma palestra intitulada “There’s a Plenty of Room at the Bottom”, no Encontro Anual da American Physical Society, California Institute of Technology – Caltech; essa palestra é considerada como o ponto inicial da nanociência ou nanotecnologia (FEYNMAN, 1960). Extrapolando as leis físicas conhecidas, Feynman visualizou uma tecnologia capaz de construir nano-objetos átomo por átomo, molécula por molécula. A partir dos anos 80, várias invenções e descobertas na fabricação de nano-objetos provaram que a visão de Feynman fazia algum sentido (BASTOS, 2006).

O primeiro grande marco tecnológico da história da nanotecnologia ocorreu em 1981, com a criação do microscópio eletrônico de tunelamento com varredura; concebido e desenvolvido por Gerd Binnig e Heinrich Rohrer, pesquisadores da filial suíça da IBM. Tal invenção levou Binnig e Rohrer a ganharem o Prêmio Nobel de Física, em 1986, e possibilitou novos avanços significativos na área da nanotecnologia (CASTRO, 2012). Desde então, a nanotecnologia vem emergindo como a próxima revolução tecnológica, com eventuais efeitos sobre todos os aspectos da vida, sendo a ciência e a engenharia os principais operadores da competição tecnológica global. Unificar a ciência com base nas características unificadoras da natureza na nanoescala fornece uma nova base para o conhecimento, inovação e integração de tecnologia (TAYLOR E FRANCIS, 2007)

1.1.1 Nanobiotecnologia

A nanobiotecnologia é considerada a fusão entre as áreas de nanotecnologia e a biotecnologia e inclui a aplicação da nanotecnologia nas ciências da vida (ALSHORA *et al.*, 2016). Para ser considerado nanobiotecnologia pelo menos um componente funcional deve possuir além do tamanho nanométrico, funções e propriedades na nanoescala que apresentam

efeitos diferentes com aplicações na área de saúde, bioquímica, biologia ou medicina (DURAN *et al.*, 2010). Portanto, a nanobiotecnologia possui diversas aplicações, por exemplo, os nanossistemas têm capacidade de localização seletiva em tecidos inflamados, podendo atuar como biomarcadores de doenças (ALLEN E CULLIS, 2004); O carregamento de fármaco em NPs modifica a distribuição celular e tecidual e leva a uma entrega mais seletiva de compostos biologicamente ativos por aumentar a eficácia da droga e reduzir sua toxicidade (ZHOU *et al.*, 2018). Além disso, as NPs superam a presença de barreira hematoencefálica, podendo ser efetivamente usadas para entregar e transportar drogas para o cérebro (ZHANG *et al.*, 2019).

1.2 Nanopartículas

As nanopartículas (NPs) pertencem à uma ampla classe de materiais que incluem substâncias particuladas e possuem uma dimensão menor que 100 nm (LAURENT *et al.*, 2010). O prefixo “nano” está relacionado a uma escala de medida em que um nanômetro representa um bilionésimo do metro ou um milionésimo do milímetro. Uma NP é uma partícula com dimensão inferior a 100 nm (THAKKAR *et al.*, 2010). Estruturas nessa escala apresentam propriedades ópticas, químicas e elétricas únicas não encontradas na escala macro, devido a sua aumentada área de superfície (CHAU *et al.*, 2007; KRUMOV *et al.*, 2009; VITHIYA e SEN, 2011).

1.2.1 Nanopartículas Metálicas

As nanopartículas metálicas (NPMs) são sistemas nanoestruturados que apresentam características físico-químico-biológicas dependentes da sua composição, tamanho e forma. Em nanoescala, alguns metais possuem uma acentuada absorção de luz na região visível do espectro, exibindo coloração distinta dos materiais em grande escala, como a cor amarela para a prata e o bordô para NPs esféricas de ouro (ZHANG e NOGUEZ, 2008). Essa absorção é atribuída ao fenômeno denominado Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (RPSL), que consiste na oscilação coletiva dos elétrons livres na superfície das NPs, criando uma densidade de carga na sua superfície (ELUMALAI e DEVIKA, 2014). A absorção e a dispersão nas regiões visíveis e no infravermelho estimularam a aplicação de materiais contendo NPMs nos campos de detecção e diagnóstico (RAMOS *et al.*, 2017).

1.2.2 Nanopartículas de Prata

Entre os diferentes tipos de MNPs, as Nanopartículas de Prata (AgNPs) são amplamente estudadas e têm sido usadas em escala muito maior que as demais NPs. A ação mais estudada das AgNPs é com relação a sua atividade antimicrobiana, porém as AgNPs possuem uma variedade de aplicações. O impacto da nanotecnologia em vários ramos da indústria e na medicina aumentou nos últimos anos, o que é refletido pelo uso das AgNPs em mais de 100 produtos do cotidiano (LI *et al.*, 2008), principalmente devido à sua capacidade de fornecer ação bioestática e biocida contra diferentes espécies; sendo exploradas em indústria têxtil (DASTJERDI E MONTAZER, 2010), indústria de embalagens e processamento de alimentos (DUNCAN, 2011), produtos agrícolas e segurança de cultivos (KHOT *et al.*, 2012), tratamento de água (LI *et al.*, 2008) e indústria da construção (LEE *et al.*, 2010), evitando danos relacionados ao crescimento microbiano.

Embora já seja demonstrado o efeito antimicrobiano das AgNPs, o mecanismo preciso por trás de sua atividade microbicida até agora não é bem compreendido (BEYTH *et al.*, 2015). No entanto, alguns mecanismos de ação antimicrobiana são bem aceitos, principalmente a liberação de íons Ag^+ , ocasionando danos na membrana celular ou parede celular; interrupção do transporte de elétrons e vias de transdução de sinal; e danos ao DNA celular e proteínas, devido a espécies reativas de oxigênio (DAKAL *et al.*, 2016; QAYYUM *et al.*, 2017).

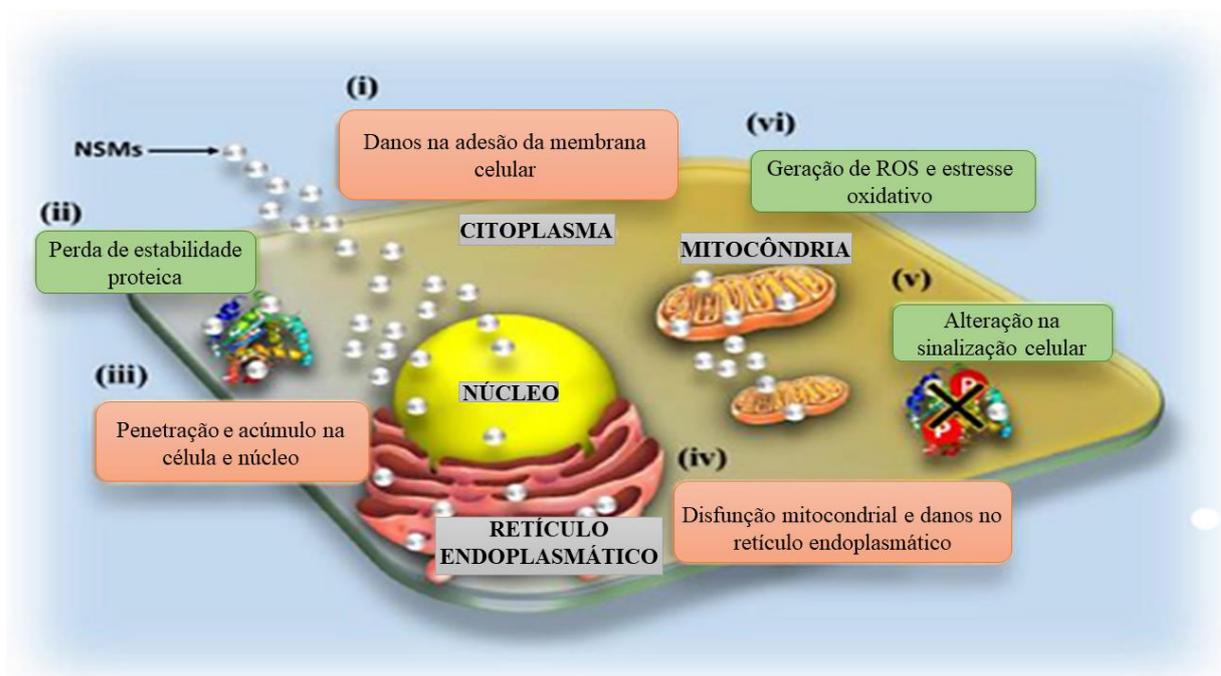


Figura 1. Ilustração mostrando os mecanismos de toxicidade gerados pelas NPs na célula:

(i) danos na adesão da membrana celular, (ii) perda da estabilidade proteica), (iii) penetração e acúmulo na célula e núcleo, (iv) disfunção mitocondrial e danos no retículo endoplasmático, (v) alteração na sinalização celular, (vi) geração de ROS e estresse oxidativo. (Adaptado de BARANWAL *et al.*, 2018).

1.2.3 Nanopartículas de Prata/Cloreto de Prata

As nanopartículas de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl-NPs) tiveram os seus primeiros registros há pouco mais de uma década (VIGNESHWARAN *et al.*, 2007) e vem sendo estudadas como mais uma alternativa para o uso biomédico (DURÁN *et al.*, 2014). Essas NPs surgiram com a proposta de ampliar e aumentar a eficiência do uso das AgNPs, visto que as Ag/AgCl-NPs compartilham muitas características físico-químicas das AgNPs, possuindo portando aplicações semelhantes, incluindo aplicações biomédicas e catalíticas (DEVI *et al.*, 2016; EUGENIO *et al.*, 2016).

As Ag/AgCl-NPs podem se apresentar de duas formas diferentes, de acordo com o seu comportamento e estrutura em solução. Uma possibilidade é produzir NPs híbridas formadas por prata e cloreto de prata, ou uma solução onde coexistem as NPs de prata e as de cloreto de prata (DURÁN *et al.*, 2016). Esse tipo de NP pode ser sintetizada por métodos químicos (CHEN *et al.*, 2012; SONG *et al.*, 2013) ou biologicamente através de fungos filamentosos e leveduriformes, bactérias, plantas, algas e enzimas (DURÁN *et al.*, 2016)

Diferente das AgNPs, que são amplamente estudadas, as Ag/AgCl-NPs ainda não tiveram suas potenciais aplicações biomédicas extensamente exploradas e também estão limitados a avaliações dos efeitos antibacterianos e antifúngicos (BOONTO *et al.*, 2016; DURÁN *et al.*, 2016). As Ag/AgCl-NPs biossintetizadas pelo nosso grupo a partir de culturas da levedura *Candida lusitaniae* demonstraram forte efeito antiproliferativo contra a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e a Gram-negativa *Klebsiella pneumoniae* (EUGENIO *et al.*, 2016) e antifúngico contra *C. albicans* e *C. lusitaniae* (EUGENIO 2017).

De acordo com DURÁN *et al.* (2016) diversos trabalhos publicados sobre a caracterização e avaliação de potenciais aplicações de AgNPs e AgCl-NPs fizeram uma interpretação incorreta de dados de difração de raios-X de nanopartículas, o que leva à erros na determinação da composição de NPs a base de prata. Deste modo, estes trabalhos foram na verdade feitos utilizando Ag/AgCl-NPs.

1.2.4 Síntese de Nanopartículas

Duas abordagens são utilizadas para a síntese de MNPs, conhecidas como “*top-down*” (de cima para baixo) e “*bottom-up*” (de baixo para cima). A estratégia *top-down* consiste na desconstrução do material macroestruturado até atingir a nanoescala, podendo ocorrer por síntese química ou física. Enquanto a abordagem *bottom-up*, que pode ser feita por síntese química ou biológica, ocorre por interações entre átomos e/ou moléculas individuais para a formação das nanoestruturas. Essa abordagem permite controlar diversos parâmetros, como a distribuição de forma e tamanho das NPs, sendo a mais utilizada na produção de NPMs (SILVA *et al.*, 2017).

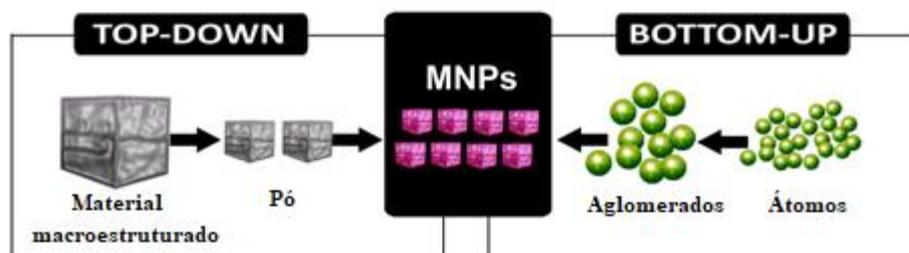


Figura 2. Desenho esquemático das abordagens *Top-down* e *Bottom-up* para a síntese de nanomateriais (Adaptado. Fonte: <https://nanografi.com/blog/metallic-nanoparticles-part-ii-top-down-and-bottomup/>).

A síntese de NPMs pode ocorrer por métodos químicos, físicos ou biológicos (VITHIYA e SEN, 2011). A síntese química é de baixo custo e apresenta boa produtividade, sendo geralmente feita em meio líquido contendo agentes redutores e estabilizantes. No entanto, as suas desvantagens incluem a contaminação das NPs com precursores químicos e geração de sub-produtos tóxicos (THAKKAR *et al.*, 2010). Para a síntese física podem ser utilizados métodos como atrito e pirólise. No método de atrito, partículas são moídas até serem reduzidas de tamanho, enquanto o método de pirólise utiliza um precursor orgânico que é queimado em alta pressão. Esses métodos apresentam baixa produtividade e alto custo, além de apresentarem grande consumo de energia (THAKKAR *et al.*, 2010).

Síntese verde é a designação comum dada às rotas de síntese que utilizam produtos químicos relativamente atóxicos, biodegradáveis e de custo baixo para sintetizar nanomateriais, tendo como fonte primária ou iniciador da rota um organismo ou partes dele (órgãos, tecidos, células, biomoléculas ou metabólitos) (SHARMA *et al.*, 2009). Dentre os recursos biológicos

disponíveis, os produtos vegetais e animais, algas, fungos e bactérias são exemplos de organismos que possuem potencial para utilização durante a síntese verde de NPMs, por meio de processos de oxirredução em meio aquoso (FARAMARZI *et al.*, 2013). Métodos biológicos de síntese de NPs podem ser interessantes, pois são conduzidos em pH, temperatura e pressões fisiológicos, possuem baixo custo e não produzem resíduos tóxicos (VITHIYA e SEN, 2011). Além disso, as grandes quantidades de proteínas secretadas naturalmente e metabólitos secundários produzidos ao usar fungos como agentes redutores produzem rapidamente grandes quantidades de NPs (KATAS *et al.*, 2018). Em certos casos, especialmente na aplicação biomédica invasiva de NPMs, as abordagens biológicas tornam-se um método de escolha em relação a outras abordagens convencionais porque essas abordagens biológicas não provocam toxicidade celular (AHMED *et al.*, 2016; BARANWAL *et al.*, 2016).

1.3 Aplicações Biomédicas de Nanopartículas

NPs de metais nobres, como o ouro e prata já são bem conhecidas e contribuem para avanços importantes na área da Biomedicina (MELO, 2011). Uma de suas vantagens é que as NPs se encontram na mesma escala de tamanho de células, cadeias de DNA, vírus e bactérias, possibilitando que as NPs interajam individualmente com esses organismos, aumentando a eficiência e a especificidade de tratamentos (GARCIA, 2011). Devido às suas propriedades ópticas oriundas da ressonância dos plasmons (LINK *et al.*, 1999), é possível encontrar estudos com as AgNPs em aplicações biomédicas como biossensores, terapia fototérmica e como agentes terapêuticos (MCNAMARA e TOFAIL, 2016). Na nanotecnologia farmacêutica, estudos demonstram a formulação de medicamentos em nanoformas biocompatíveis, que traz benefícios na administração de medicamentos, aumentando a eficiência e a segurança dos medicamentos, por exemplo, melhorando a biodisponibilidade, fornecendo entrega direcionada de medicamentos, aumentando a estabilidade do medicamento e estendendo o efeito do medicamento no tecido alvo (MOGHINI *et al.* 2001). Na terapia contra o câncer, nanopartículas metálicas bioconjugadas vêm sendo propostas não só para o diagnóstico, mas também para seu tratamento (HIRSCH *et al.*, 2003). Estudos recentes identificaram as propriedades antivirais de amplo espectro das AgNPs contra patógenos respiratórios, como adenovírus (JACKSON *et al.*, 2020), parainfluenza (GAIKWAD *et al.*, 2013) e influenza (ALGHRAIR *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2018; LIN *et al.*, 2017). Além de possuir efeito antibacteriano (GURUNATHAN *et al.*, 2014), as AgNPs também possuem atividade antifúngica, como relatado em estudos feitos por

XUE *et al.* (2016) demonstrando que nanopartículas de prata sintetizadas pelo fungo *Arthroderma fulvum* possui ação antifúngica contra dez espécies testadas sendo quatro do gênero *Candida* spp., três do gênero *Aspergillus* spp. e outras três do gênero *Fusarium* spp. Além disso, AgNPs foram demonstradas como capazes não só de inibir a formação de biofilme, mas também são eficazes contra biofilmes já formados por *Candida albicans* (LARA *et al.*, 2015).

1.4 O gênero *Cryptococcus* spp.

Cryptococcus spp. inclui mais de 50 espécies, sendo as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, considerados as duas principais espécies patogênicas deste grupo e compartilham uma série de propriedades; como a alta virulência, estágios ambientais de vida longa e potencial para ampla dispersão e rápida mudança evolutiva (REOLON *et al.*, 2004; FISHER *et al.*, 2012). Fungos do gênero *Cryptococcus* são importantes micro-organismos oportunistas que levam ao desenvolvimento de uma micose primariamente pulmonar, e que apresentam tropismo para sistema nervoso central. São fungos leveduriformes com colônias de cor branca a creme, brilhantes, com textura mucoide e margem lisa (KON *et al.*, 2008).

C. neoformans possui distribuição mundial, tendo principalmente como habitat natural as excretas de aves, especialmente de *Columba livia* (pombos domésticos), podendo também ser encontrado em solos, animais e nematoides; *C. neoformans* acomete grupos de indivíduos imunocomprometidos (FARIA *et al.*, 2010). Em contraste, *C. gattii* é capaz de infectar indivíduos imunocompetentes, e possui prevalência em regiões tropicais e subtropicais, tendo como habitat natural os eucaliptos e material vegetal em decomposição. No Brasil, já foi relatado o isolamento desta espécie em árvores nativas, como as árvores da região de Floresta Atlântica do estado de Espírito Santo (ELLIS; PFEIFFER, 1990; BALTAZAR *et al.*, 2008; GIACOMAZZI *et al.*, 2016). *C. liquifaciens* é uma levedura ambiental, associada a ambientes marinhos (MINEGISHI *et al.*, 2006) e presente em caracóis da espécie *Achatina fulica* (ARAUJO *et al.*, 2012). *C. liquifaciens* não é patogênica para mamíferos e sua incapacidade de causar doenças tem sido atribuída à falta de termotolerância em temperaturas de mamíferos (ARAUJO *et al.*, 2012). Apesar disso, recentemente foram descritos os primeiros casos de fungemia humana causado por *C. liquefaciens* em pacientes imunocomprometidos (TAKEMURA *et al.*, 2015).

1.5 Criptococose

A criptococose é uma micose primariamente pulmonar, sendo adquirida por inalação, mas pode também disseminar-se, provavelmente em muitos casos após um período latente de contenção nos gânglios linfáticos do pulmão (ALANIO *et al.*, 2015). Estudos brasileiros colocaram a criptococose como primeira causa de mortalidade entre todas as micoses sistêmicas associadas à AIDS e a segunda causa de mortalidade entre as micoses sistêmicas em geral (SOARES *et al.*, 2019). Os quadros clínicos mais comuns desta micose são meningoencefalite (neurocriptococose) e infecção pulmonar (criptococose pulmonar) (DARZÉ *et al.*, 2000; MOREIRA *et al.*, 2006). O neurotropismo de *Cryptococcus* tem sido associado a vários fatores de virulência que facilitam a sua penetração na barreira hematoencefálica, como a produção de metaloproteinases e ureases específicas; enzimas que causam neuroimunomodulação; e mecanismos que facilitam a sobrevivência dentro do ambiente desprovido de nutrientes do cérebro, como a autofagia e os transportadores de açúcar de alta afinidade (COELHO *et al.*, 2014). Apesar da grande predileção de *C. neoformans* e *C. gattii* por estabelecer doenças nos pulmões e no SNC, outros locais menos frequentes de infecção no corpo incluem pele, olhos, próstata e ossos / articulações. No entanto, deve-se enfatizar que essa levedura pode disseminar e infectar amplamente a maioria dos órgãos em pacientes gravemente imunossuprimidos e, portanto, tem a capacidade de infectar qualquer local do corpo humano (MARIARZ e PERFECT, 2016).

No Brasil, um levantamento realizado por SOARES *et al.*, 2019 sobre a taxa de mortalidade causada por criptococose entre o período de 2000 a 2012 mostrou que entre os casos de mortalidade 19,5% registraram a criptococose como causa básica da morte, com uma taxa de 6,19 / milhão de habitantes; e 80,5% registraram a criptococose associada à fatores de risco, principalmente AIDS (75%), seguidos por outros riscos do hospedeiro (5,5%), com uma taxa de mortalidade de 25,19 / milhão de habitantes. A meningite foi a forma clínica predominante (80%), tendo acometido 69% de indivíduos do sexo masculino com idade média de 39,5 anos. As taxas de mortalidade por criptococose como causa associada foram maiores nos estados de Santa Catarina (70,41 / milhão de habitantes) e Rio Grande do Sul (64,40 / milhão de habitantes), enquanto a maior taxa de mortalidade por criptococose como causa básica ocorreu no estado de Mato Grosso (10,96 / milhão de habitantes); ambos na região sul (SOARES *et al.*, 2019).

1.6 Fatores de Virulência

De acordo com Kozel (1995), fatores de virulência podem ser definidos como os produtos moleculares que permitem a sobrevivência da levedura dentro do hospedeiro, causando doenças. A patogênese da criptococose é multifatorial e envolve a ação conjunta de muitos fatores de virulência. Ao contrário das potentes toxinas produzidas por muitos patógenos bacterianos, *C. neoformans* não parece produzir produtos abertamente tóxicos que contribuem diretamente para os sinais e sintomas da criptococose. As contribuições dos fatores de virulência mais conhecidos para o processo da doença são sutis e, em muitos casos, estão relacionadas à melhoria da sobrevivência da levedura no hospedeiro (KOZEL, 1995).

O patógeno fúngico humano *C. neoformans* é capaz de se adaptar rápida e eficazmente a condições variáveis, favorecendo sua sobrevivência no ambiente e no hospedeiro infectado (COELHO *et al.*, 2014). Muitos fenótipos microbianos são correlacionados com a virulência neste patógeno oportunista, como a produção de cápsulas, a formação de melanina e a secreção de várias proteínas (KOZEL, 1995). A capacidade de sobrevivência a temperatura corporal do hospedeiro também é um fator importante. Além disso, as características celulares, como a parede celular e a morfogênese, desempenham papéis importantes na interação desse fungo com as vias de resposta e reconhecimento imunológico do hospedeiro. Sobrevivência diante do estresse do hospedeiro também requer a manutenção da integridade do RNA/DNA. Além disso, o envelhecimento e a senescência das células fúngicas determinam resistência a estresses derivados do hospedeiro (ALSPAUGH, 2014).

1.6.1 Cápsula

A produção de cápsulas de polissacarídeos é comum entre patógenos bacterianos, mas relativamente rara em micro-organismos eucarióticos. Em fungos, o gênero *Cryptococcus* é conhecido pela produção de cápsulas, que são consideradas como os principais determinantes da virulência em espécies patogênicas desse gênero (ARAÚJO *et al.*, 2012). A cápsula de *C. neoformans* é composta de polissacarídeos complexos que são sintetizados dentro da célula, transportados através da parede celular por vesículas e então fixados de forma não covalente à superfície celular, onde podem ser montados em polímeros longos. Estudos demonstram que a

cápsula é composta principalmente pelos polissacarídeos glucuronoxilomanano (GXM) e glucuronoxilomannogalactano (GXMGal) (OMEARA E ALSPAUGH, 2012).

Tanto no ambiente como no hospedeiro infectado, *Cryptococcus* spp. produz uma cápsula polissacarídica característica. Especula-se que esta cápsula traz proteção ao fungo com relação a dessecação ambiental e/ou de predadores naturais, como nematóides ou amebas (OMEARA e ALSPAUGH, 2012). Estudos realizados por ARAUJO *et al.* (2012) demonstraram semelhanças na composição e estrutura entre a cápsula da espécie patogênica *C. neoformans*, e *C. liquefaciens* (não patogênica). No hospedeiro, a cápsula atende a muitas funções de proteção, incluindo a redução da resposta imune do hospedeiro pela regulação negativa de citocinas inflamatórias, depleção de componentes do complemento e inibição da capacidade de apresentação de antígenos de monócitos (PFEIFFER e ELLIS, 1992; POETA *et al.*, 1999.). A cápsula também pode atuar como um escudo na parede celular para regular a fagocitose por macrófagos (MYLONAKIS *et al.*, 2002). Uma vez dentro dos macrófagos, a cápsula serve como um depósito para espécies reativas de oxigênio geradas pelo hospedeiro, proporcionando assim defesas antioxidantes efetivas (OMEARA e ALSPAUGH, 2012).

O tamanho da cápsula é variável, podendo ter de 5 a 30 μm (FELDMESSER *et al.*, 2001; RIVERA, *et al.*, 1998), variando entre as linhagens (NEILSON *et al.*, 1977), e dependendo das condições ambientais em que estão submetidos (FRASES *et al.*, 2009). Em solos e em condições de laboratório, o tamanho da cápsula da maioria das cepas de *Cryptococcus* spp. é relativamente pequeno, mas pode sofrer modificação, aumentando de tamanho durante a infecção de mamíferos (BERGMAN, 1965; CRUICKSHANK *et al.*, 1973; LOVE *et al.*, 1985). Durante a infecção *in vivo*, o tamanho da cápsula varia dependendo do órgão estudado. O ambiente pulmonar, por exemplo, é um poderoso indutor do crescimento da cápsula (RIVERA *et al.*, 1998). Outro compartimento que induz o crescimento da cápsula, embora não tão eficientemente quanto o pulmão, é o cérebro (FARHI *et al.*, 1970; RIVERA *et al.*, 1998).

1.7 Ciclo de infecção de *Cryptococcus*

Em forma de levedura, *Cryptococcus* sobrevive no ambiente estando presente no solo normalmente contaminado com excretas de aves e em árvores. Aves, especialmente os pombos, estão associados com a dispersão mundial de *Cryptococcus*. O fungo pode sobreviver a predadores ambientais, como vermes, amebas e insetos e pode interagir com outros micro-

organismos, como fungos e bactérias. Além disso, vários animais, como gatos, coala e cabras podem ser infectados. Através da inalação de seus esporos ou pequenas células de levedura dessecadas de fontes ambientais, o fungo estabelece uma infecção pulmonar primária no hospedeiro (LIN E HEITMAN, 2006). Estudos soroepidemiológicos indicam que a maioria das pessoas em áreas onde o fungo é endêmico é exposta a ele em uma idade jovem; no entanto, em hospedeiros imunocompetentes, as infecções por *C. neoformans* são minimamente sintomáticas e rapidamente eliminadas (GOLDMAN, *et al.* 2001). A doença grave ocorre na ausência de imunidade mediada por células inatas, como em pacientes com AIDS avançada ou receptores de transplantes de órgãos que recebem terapias imunossupressoras (OMEARA E ALPAUGH, 2012). Nesses hospedeiros imunocomprometidos, o *C. neoformans* pode se reativar a partir de formas latentes e adormecidas, se disseminando a partir dos pulmões e atravessar a barreira hematoencefálica, frequentemente resultando em meningite criptocócica, uma infecção do SNC, representando a forma mais grave de criptococose humana e que é fatal se não for tratada (LIN E HEITMAN, 2006).

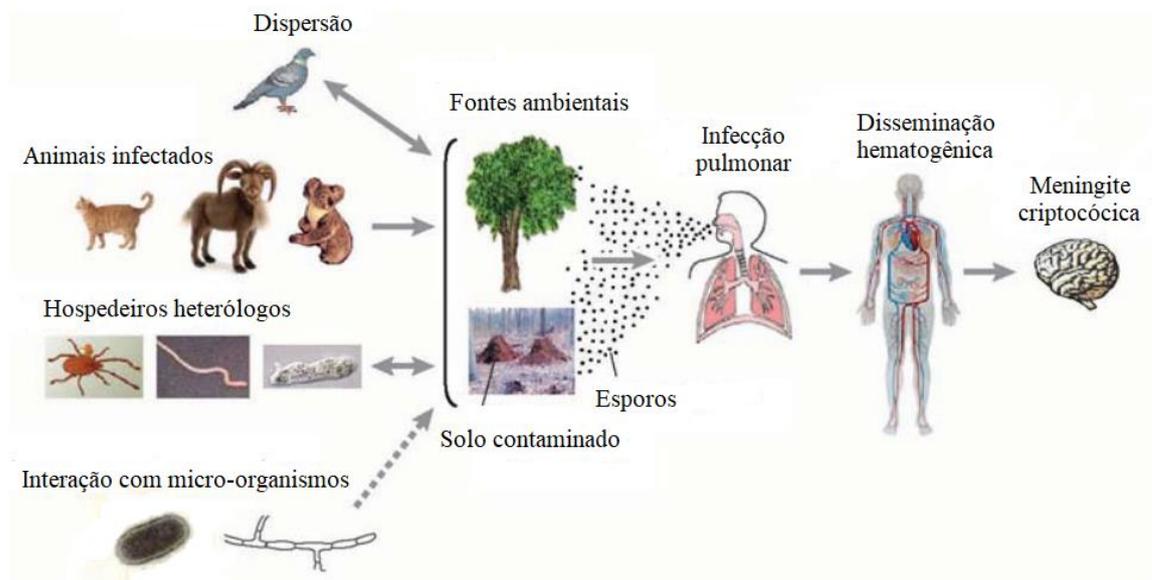


Figura 3. Desenho esquemático do ciclo de infecção de *Cryptococcus* spp. Em forma de levedura, *Cryptococcus* sobrevive no ambiente estando presente no solo normalmente contaminado com excretas de aves, e em árvores. Os pombos são responsáveis pela dispersão mundial de *Cryptococcus*, podendo infectar animais, como gatos, coala e cabras. Além disso, o fungo pode sobreviver a predadores ambientais, como vermes, amebas e insetos, e interagir com outros micro-organismos, como fungos e bactérias. Através da inalação de seus esporos ou pequenas células de levedura dessecadas de fontes ambientais, o fungo estabelece uma

infecção pulmonar primária no hospedeiro, podendo levar a uma disseminação hematogênica e meningite criptocócica (Adaptado de LIN E HEITMAN, 2006).

1.8 Tratamento e Resistência a drogas

A anfotericina B, um metabólito secundário de *Streptomyces nodosus*, tem sido o principal agente terapêutico da meningoencefalite criptocócica desde o final da década de 1960 (SAROSI *et al.*, 1969). Embora às vezes usado sozinho, tornou-se comum no início dos anos 80 o uso deste polieno em combinação com flucitosina, um análogo de pirimidina fluorada (BENNETT *et al.*, 1979). Após a liberação do fluconazol em 1990, a combinação entre anfotericina B e flucitosina para terapia de indução foi expandido para ser seguido por manutenção com fluconazol (YAO *et al.*, 2014). Além disso, a estratégia de tratamento para a criptococose pode variar dependendo das diferentes categorias de grupos de risco: pacientes infectados pelo HIV, receptores de transplantes de órgãos, pacientes não infectados pelo HIV e não transplantes. Recomendações específicas também existem para outros grupos de risco, como mulheres grávidas, pacientes em ambientes com recursos limitados e aqueles com infecção por *C. gattii* (PERFECT *et al.*, 2010).

Há relatos de resistência criptocócica a drogas antifúngicas, sendo as cepas resistentes ao fluconazol as mais comuns, decorrentes de pacientes com AIDS submetidos à terapia de manutenção com azóis de longo prazo (SMITH *et al.*, 2015; MPOZA *et al.*, 2018; MANFREDI *et al.*, 2006; PAUGAM *et al.*, 1994; RODERO *et al.*, 2003; PFALLER *et al.*, 2011; SIONOV *et al.*, 2012). Fatores como monoterapia com doses inadequadas de fluconazol para meningite criptocócica, assim como uma não adesão ao medicamento e interrupções no fluconazol durante as fases de consolidação e manutenção de terapia também podem estar associados com a resistência (MPOZA *et al.*, 2018)

2. Justificativa

Segundo a OMS (2014), infecções fúngicas são relativamente negligenciadas em algumas regiões do mundo, gerado pela falta de recursos apropriados. Como consequência, vem crescendo consideravelmente a prevalência de resistência de drogas antifúngicas (ROSSI *et al.*, 2011). Além disso, os recursos alocados para estudar, monitorar e reduzir a resistência aos medicamentos antifúngicos são bastante limitados, principalmente em comparação aos antibacterianos (OMS, 2014). A multirresistência em micro-organismos é uma questão de grande preocupação, sendo relatado como a principal causa de morte mundial (CABALLERO, 2014). E devido a ineficácia dos tratamentos atuais, é necessária a busca de novas alternativas para o tratamento dessas doenças (RODRIGUES e SOUZA, 2008).

Nesse contexto, as NPMs vêm mostrando resultados promissores *in vitro* como eficientes agentes antimicrobianos inclusive contra alguns micro-organismos resistentes e até o momento há raríssimos relatos de micro-organismos resistentes a nanopartículas metálicas (LEMIRE *et al.*, 2013). NPMs sintetizadas biologicamente têm sido cada vez mais utilizadas nas pesquisas devido às suas vantagens, incluindo alta estabilidade e capacidade de carga, além de serem sintetizadas usando um método econômico, não tóxico e ecológico (KATAS *et al.*, 2018). Apesar das AgNPs serem bastante estudadas por terem efeito bactericida e antifúngico comprovado, as NPs a base de prata, incluindo as Ag/AgCl-NPs, recebem pouco destaque na pesquisa científica e aplicações industriais. Porém, por possuírem em sua composição a prata, esses tipos de nanopartículas compartilham de muitas características observadas nas AgNPs (PAULKUMAR *et al.*, 2013).

Os fungos do gênero *Cryptococcus* spp. levam ao desencadeamento de uma micose primariamente pulmonar e que apresentam tropismo para o sistema nervoso central (LIMA *et al.*, 2015). *C. neoformans* é uma das principais causas de meningoencefalite fúngica em pacientes imunocomprometidos (HEITMAN, 2006). Os fatores de virulência fúngica são essenciais para a sobrevivência das leveduras no ambiente, pelo fato de que os fungos tradicionalmente considerados como não patogênicos para humanos têm fatores de virulência semelhantes aos patogênicos do mesmo gênero (ZARAGOZA, 2019). Dessa forma, estudos comparando cepas diferentes são importantes para um melhor entendimento sobre a interação entre *Cryptococcus* spp. e o hospedeiro.

Com base no exposto, este trabalho visa a utilização de Ag/AgCl-NPs de origem biológica para análises sobre seus efeitos antifúngicos, analisando a interação entre as Ag/AgCl- NPs e leveduras do gênero *Cryptococcus* observando alterações envolvendo a cápsula polissacarídica que compõe estas leveduras.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial antifúngico de Ag/AgCl- NPs, analisando a interação entre as Ag/AgCl- NPs e as leveduras *C. liquefaciens*, *C. gattii* e *C. neoformans* e alterações morfológicas envolvendo a cápsula polissacarídica que compõe estas leveduras.

3.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar o efeito de Ag/AgCl-NPs na proliferação em *Cryptococcus* spp. (*C. liquefaciens*, *C. gattii* e *C. neoformans*) em meio mínimo e em meio enriquecido;
2. Analisar se o tratamento com as Ag/AgCl-NPs afeta a viabilidade das leveduras *C. liquefaciens*, *C. gattii* e *C. neoformans*;
3. Analisar se há diferença na espessura da cápsula após o tratamento com Ag/AgCl-NPs;
4. Investigar alterações ultraestruturais na cápsula polissacarídica de *Cryptococcus* spp. após a interação com Ag/AgCl-NPs.

4. Materiais e Métodos

4.1 Cepas utilizadas e condições de cultivo das Leveduras

Para a realização dos experimentos deste trabalho foram utilizadas as seguintes cepas de *Cryptococcus spp.*: *C. neoformans var. grubii H99*; *C. liquefaciens* isolada do caramujo *Achatina fulica*; e *C. gattii* L25/01. Todas as cepas foram gentilmente cedidas pela Dra. Susana Frases (Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro). As cepas foram cultivadas a 30 °C em meio de cultura líquido Sabouraud (Himedia M033-500g/ Lot: 0000112861), em placas de Ágar Sabouraud Dextrose (Himedia M063-500g) e em estoques contendo 20% de glicerol na temperatura de -80 °C.

4.2 Nanopartículas de Prata/Cloreto de Prata (Ag/AgCl-NPs)

A biossíntese das nanopartículas foi realizada de acordo com EUGENIO *et al.*, 2016. Em resumo, leveduras da espécie *Candida lusitanae* foram cultivadas por 24h a 30°C em meio rico (4% de glicose, 1% de peptona bacteriológica e 1% de extrato de levedura, pH 6,5). Após 24h de crescimento, foi adicionado nitrato de prata (Merck) para ficar a uma concentração final de 3,5 mM. As células foram, então, cultivadas por 7 dias a 30°C, ao abrigo da luz e sob agitação a 150 rpm. Posteriormente, o cultivo foi centrifugado a 2720g por 15 min visando a separação das leveduras do meio de cultivo contendo nanopartículas. Em seguida, o sobrenadante foi centrifugado a 38360g por 20 min. O *pellet*, contendo Ag/AgCl-NPs foi ressuspensão em citrato de sódio 1%.

4.3 Avaliação do efeito antiproliferativo de Ag/AgCl-NPs em *Cryptococcus spp.*

Para avaliar a atividade antifúngica das Ag/AgCl-NPs produzidas por síntese biológica utilizando *C. intermedia* (EUGENIO, 2016), as leveduras *C. gattii*, *C. liquefaciens* e *C. neoformans* foram cultivadas em meio mínimo (15 mM glicose, 10 mM MgSO₄·7H₂O, 29 mM KH₂PO₄, 13 mM glicina e 3 µM) ou meio Sabouraud como condição controle (não tratado) e em meio mínimo ou meio Sabouraud contendo 0 a 125 µg/mL de NPs. Foram realizados controles do meio de cultura puro e meio de cultura com a adição de Ag/AgCl-NPs. O meio de cultura puro foi usado como branco, enquanto os valores obtidos dos tubos contendo meio com Ag/AgCl-NPs foram subtraídos dos valores obtidos pelos tubos contendo as leveduras, para

garantir que a densidade óptica (DO) considerada fosse apenas dos micro-organismos, sem influência da absorbância das Ag/AgCl-NPs. Todos os experimentos foram realizados em triplicata utilizando tubos tipo Falcon com capacidade para 15 mL e mantidos por 5 dias a 30° C, sob agitação de 150 RPM em incubadoras. Em seguida, as densidades celulares foram acompanhadas por medição da DO a 540 nm, utilizando um espectrofotômetro de UV-Visível Molecular Devices Spectra Max 190 (Sunnyvale, EUA). Foram obtidos valores de DO por UV-Vis em 3 e 5 dias após o inóculo e adição dos tratamentos, para o acompanhamento da curva de crescimento.

4.4. Determinação do IC₅₀

Com os resultados de proliferação celular foi calculado o valor de IC₅₀ (concentração que inibe 50% da proliferação celular) das culturas tratadas, nos tempos de 3 e 5 dias, através do *software* Graphpad Prism 5.

4.5 Ensaio de viabilidade celular

O número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi utilizado como método para avaliar a viabilidade de *C. liquefaciens*, *C. gattii* e *C. neoformans* tratadas com nanopartículas. Após os 5 dias de tratamento com as Ag/AgCl-NPs com meio líquido em tubos do tipo falcon, como descrito anteriormente, foram realizadas diluições de 1:1000 e alíquotas de 10 µL foram espalhadas em placas de petri contendo meio Sabouraud Ágar. As placas de petri foram incubadas a 30 °C por 48 horas e o número de colônias foi contado. Células não tratadas foram usadas como controle e todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

4.6 Contrastação com tinta Nanquim – Microscopia Óptica de Campo Claro

Para essa análise, leveduras tratadas na concentração de IC₅₀ de Ag/AgCl-NPs por 5 dias foram centrifugadas a 3200g por 5 minutos, lavadas com PBS, e coradas com tinta Nanquim em uma proporção de 1:1. Posteriormente, as imagens foram analisadas utilizando Microscópio Óptico de Campo Claro.

4.7 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para investigar alterações ultraestruturais, as leveduras foram tratadas por 72 h na concentração de IC₅₀ de Ag/AgCl-NP e em seguida foram submetidas ao protocolo de fixação para amostras biológicas, utilizando 2,5 % glutaraldeído e 4% formaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e pH 7,2. Após fixadas as amostras passaram por etapas de desidratação, sendo submetidas a soluções concentradas crescentes de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%) permanecendo por 20 minutos em cada. Posteriormente, as amostras foram secas pelo método de ponto crítico (LEICA CPD 030), e revestidas no metalizador (LEICA SCD 500) com 10 nm de platina para análises utilizando elétrons secundários; e metalizadas com carbono para análises com elétrons retroespehados. Por fim, as amostras foram observadas no microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 450F (5 kV).

4.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Após o tratamento das leveduras com a concentração de IC₅₀ das Ag/AgCl-NPs em 72 h, todas as amostras preparadas foram submetidas ao protocolo de fixação para amostras biológicas utilizando 2,5 % glutaraldeído e 4% formaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e pH 7,2, como mencionado anteriormente. As amostras fixadas foram lavadas 3x com tampão cacodilato 0,1 M, e expostas a tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto 0,8% por 1h sem contato com a luz. Após 1h as amostras foram lavadas 3x e posteriormente foram iniciadas as etapas de desidratação com etanol (30, 50, 70, 90 e 3x de 100%), por 20 minutos em cada etapa. Em seguida, as amostras foram infiltradas em séries de etanol:resina Spurr nas proporções de 2:1, 1:1, 1:2, por 24 h em cada etapa e com 100% de resina pura por 6h. Após as etapas de infiltrações, as amostras foram emblocadas em 100% de Spurr + catalizador para polimerização a 60 ° C por 48 horas. Após o resfriamento, foram realizados cortes ultrafinos (60 nm) das amostras, que passaram pela etapa de contrastação com acetato de uranila e citrato de chumbo e finalmente observadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão FEI Tecnai Spirit Biotwin, operando a 80 KV.

4.9 Análises estatísticas

A análise estatística dos resultados foi realizada através do teste ANOVA, utilizando o intervalo de confiança de 95%, a fim de verificar as diferenças entre os grupos. Para a realização dos testes utilizou-se o software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA).

5. Resultados

5.1 Avaliação do efeito antiproliferativo de Ag/AgCl-NPs em *Cryptococcus* spp.

As Ag/AgCl-NPs biossintetizadas pela levedura *C. intermedia* foram analisadas quanto à sua atividade antiproliferativa contra as leveduras *C. neoformans*, *C. gattii* e *C. liquefaciens*, nos tempos de 3 e 5 dias. Esse ensaio de proliferação foi realizado a partir do tratamento das leveduras em concentrações de 0 a 125 µg/mL de Ag/AgCl-NPs, em meio mínimo e em meio Sabouraud. Em meio mínimo, observamos em 3 dias para *C. liquefaciens* (figura 4a), que desde a menor concentração testada (1 µg/mL) houve uma evidente inibição da proliferação celular (81, 3%), que se manteve sem muitas alterações até a concentração de 125 µg/mL. A concentração que levou a um maior efeito inibitório foi a de 3 µg/mL, com 85,79% de inibição. Em 5 dias de tratamento de Ag/AgCl-NPs para *C. liquefaciens* (figura 4c), a concentração de 1 µg/mL teve uma redução em seu efeito antiproliferativo, mostrando uma inibição de 69,14% e observamos uma inibição máxima de 91,17 % na concentração de 75 µg/mL. Para *C. gattii*, em meio mínimo, após 3 dias de tratamento (figura 4e) foi possível observar uma redução de apenas 25,19% da proliferação na concentração de 1 µg/mL e uma inibição máxima de 90,85% na concentração de 100 µg/mL. Após os 5 dias de tratamento (figura 4g), os resultados estatísticos mostraram que na concentração de 1 µg/mL não houve diferença significativa comparado ao grupo controle. Já na concentração de 2 µg/mL, foi possível observar uma redução de 78,34% do crescimento celular, chegando a uma inibição máxima de 91,17% na concentração de 75 µg/mL. Para *C. neoformans*, o efeito antiproliferativo dos tratamentos de 5 a 125 µg/mL se mantiveram sem alterações, inibindo ± 85% da proliferação em 3 dias (figura 4i) e ± 90% em 5 dias (figura 4k).

Em meio Sabouraud, para *C. liquefaciens*, a análise estatística mostrou que só houve diferença significativa comparado com o grupo controle a partir de 10 µg/mL (figura 4b),

atingindo inibição máxima de 85,93% em 75 µg/mL após 3 dias de tratamentos, e 87,61% em 125 µg/mL após os 5 dias de tratamentos (figura 4d). Para *C. gattii*, em 3 dias (figura 4f) foi possível observar uma inibição de 30% na concentração de 5 µg/mL, que posteriormente se manteve sem muitas alterações nas concentrações de 10 a 125 µg/mL com 75% de inibição. Em 5 dias de tratamento (figura 4h), o efeito antiproliferativo foi visto a partir de 25 µg/mL, que se manteve sem muitas alterações até 125 µg/mL, com 77% de inibição. Para *C. neoformans*, em 3 dias foi visto a partir de 25 µg/mL que a proliferação se manteve sem muitas alterações até 75 µg/mL com 75% de inibição, em 100 µg/mL houve um pequeno aumento da inibição do crescimento de 79%, atingindo o máximo de 88% em 125 µg/mL. Em 5 dias a partir de 25 µg/mL a inibição é de 69%, atingindo ao máximo de 83% em 125 µg/mL.

Os valores de IC₅₀ (Tabela 1) foram calculados após 3 e 5 dias dos tratamentos com as Ag/AgCl-NPs para *C. neoformans*, *C. gattii* e *C. liquefaciens*, em meio mínimo e em meio Sabouraud. Como o IC₅₀ representa a concentração necessária para inibir 50% da proliferação celular, quanto menor for o valor do IC₅₀, mais sensível é o micro-organismo para este tratamento. Dessa forma, observou-se um padrão de resposta parecido entre as espécies *C. liquefaciens* e *C. gattii*. A espécie *C. liquefaciens* apresentou em meio Sabouraud como valores de IC₅₀ 4,55 µg/mL em 3 dias e 6,89 µg/mL em 5 dias; já em meio mínimo os valores foram 1,01 µg/mL e 0,87 µg/mL em 3 e 5 dias, respectivamente. Em meio Sabouraud, *C. gattii* apresentou 5,39 µg/mL em 3 dias e 4,53 µg/mL em 5 dias; já em meio mínimo os valores foram 1,24 µg/mL e 1,53 µg/mL em 3 e 5 dias. Já a espécie *C. neoformans* apresentou 13,66 µg/mL e 15,91 µg/mL em meio sabouraud em 3 e 5 dias, respectivamente e em meio mínimo 2,88 µg/mL em 3 dias e 2,98 µg/mL em 5 dias. Esses resultados mostraram que entre as três espécies estudadas neste trabalho, *C. neoformans* foi a menos sensível ao tratamento com as Ag/AgCl-NPs e *C. liquefaciens* foi a espécie mais sensível.

Meio Mínimo

Meio Sabouraud

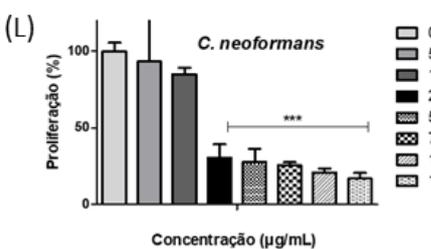
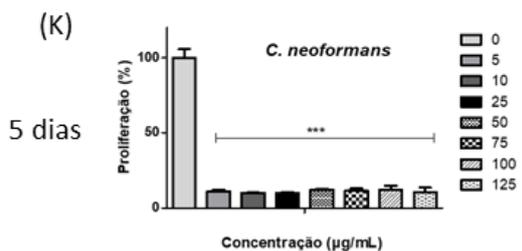
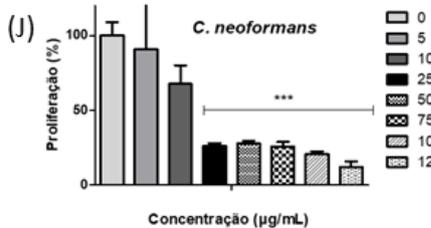
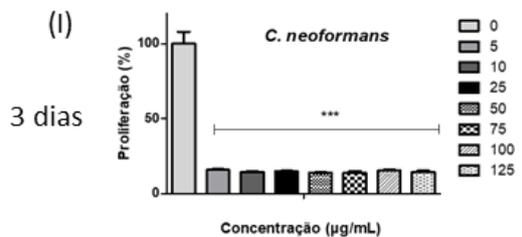
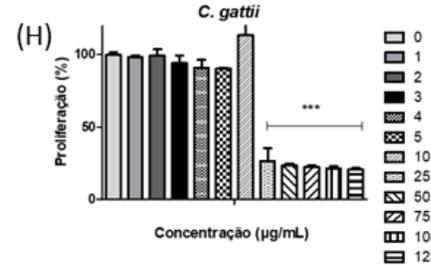
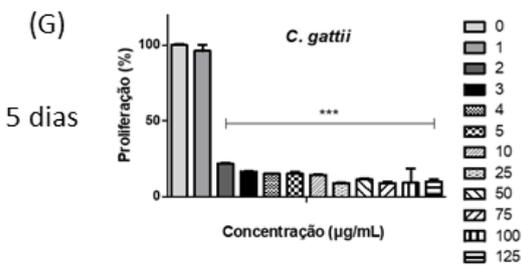
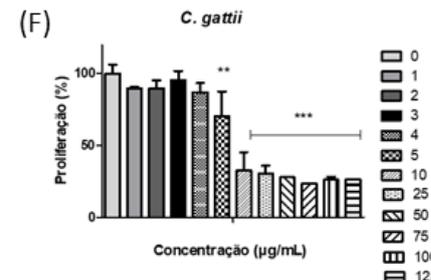
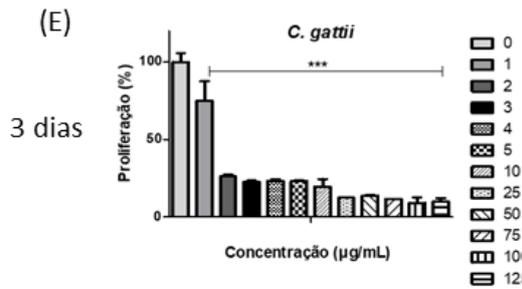
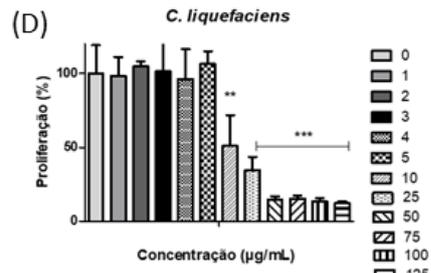
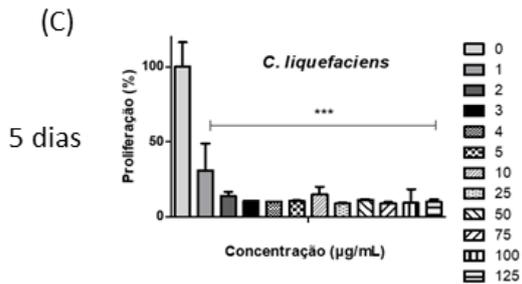
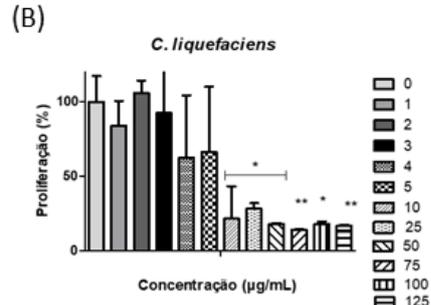
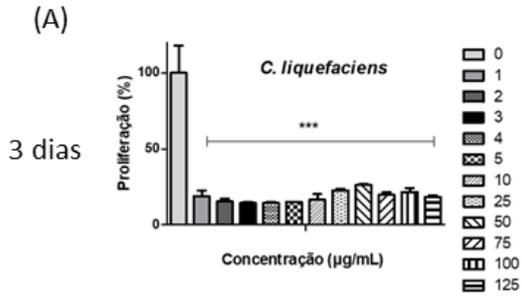


Figura 4. Ensaio de proliferação em *Cryptococcus spp.* As espécies (a,b,c,d) *C. liquefaciens*, (e,f,g,h) *C. gattii*, e (i,j,k,l) *C. neoformans* foram cultivadas por 3 e 5 dias com concentrações entre 0 a 125 µg/mL de Ag/AgCl-NPs, e posteriormente foi realizada leitura em espectrofotômetro para a análise da densidade óptica. * P <0,05, ** P <0,01, *** P <0,001 (Anova Two-way).

Tempo (dias)	Espécie	IC ₅₀ (µg/mL)	
		Meio Sabouraud	Meio Mínimo
3	<i>C. liquefaciens</i>	4,55	1,01
5	<i>C. liquefaciens</i>	6,89	0,87
3	<i>C. gattii</i>	5,39	1,24
5	<i>C. gattii</i>	4,53	1,53
3	<i>C. neoformans</i>	13,66	2,88
5	<i>C. neoformans</i>	15,91	2,98

Tabela 1. Valores de IC₅₀ encontrados após os tratamentos com Ag/AgCl-NPs em 3 e 5 dias.

5.2 Análise da Viabilidade Celular

As espécies *C. liquefaciens*, *C. gattii* e *C. neoformans* tiveram a viabilidade celular avaliada após os 5 dias de tratamentos com Ag/AgCl-NPs, em meio mínimo e meio Sabouraud, com concentrações entre 0 a 125 µg/mL. Os resultados demonstraram que em meio mínimo todas as concentrações de Ag/AgCl-NPs afetaram significativamente a viabilidade celular das três espécies, de modo que *C. liquefaciens* apresentou 73,4 % de redução de viabilidade em 1 µg/mL e 100% de perda da viabilidade foi observada nas concentrações de 4 e 5 µg/mL. Em meio mínimo, 1 µg/mL de Ag/AgCl-NPs levou a 91% de perda da viabilidade em *C. gattii* e 99,2% de perda da viabilidade em 5 e 10 µg/mL. Para *C. neoformans*, observamos 73,5% de perda de viabilidade em 5 µg/mL e 96%, 96%, 90,8%, 100%, 100% e 99% em 10, 25, 50, 75, 100 e 125 µg/mL, respectivamente. Por outro lado, em meio sabouraud, a espécie *C. liquefaciens* quando tratada em concentrações de 0 a 50 de µg/mL Ag/AgCl-NPs, manteve a viabilidade celular igual ao grupo controle, porém em 75, 100 e 125 µg/mL apresentou reduções de 100%, 79,3% e 97,7% na viabilidade celular em relação ao grupo controle, respectivamente. Para *C. gattii*, tratamentos de 5, 10, 25, 50, 75, 100 e 125 µg/mL de Ag/AgCl-NPs apresentaram

reduções de 69%, 57,5%, 96,6%, 96,8%, 97,9%, 100% e 100% na viabilidade celular em relação ao grupo controle, respectivamente. Já para *C. neoformans*, tratamentos em sabouraud em concentrações de 0 a 25 de $\mu\text{g/mL}$ Ag/AgCl-NPs, mantiveram a viabilidade celular igual ao grupo controle, porém nas concentrações de 50, 75, 100 e 125 $\mu\text{g/mL}$ observamos reduções de 94,9%, 99,3%, 100% e 99,8% na viabilidade celular em relação ao grupo controle, respectivamente.

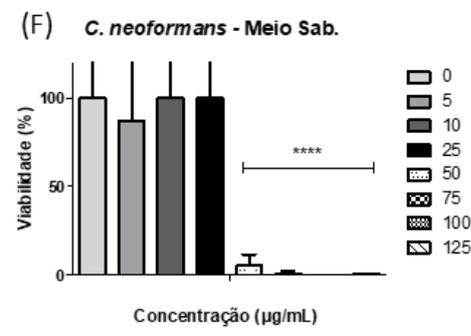
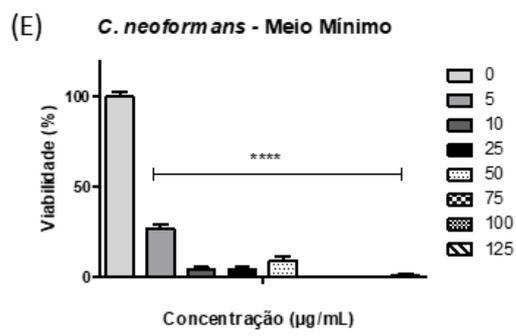
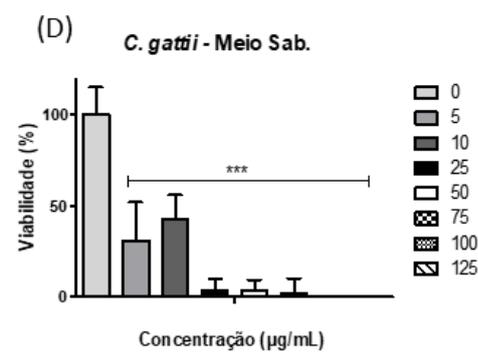
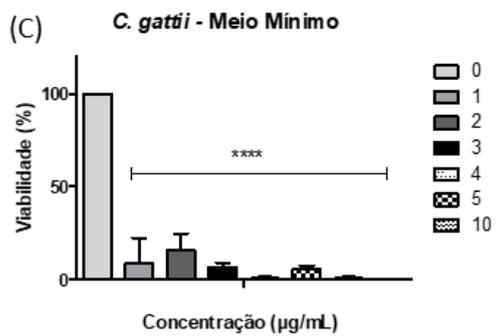
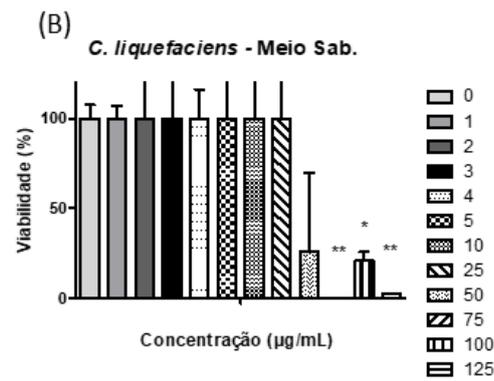
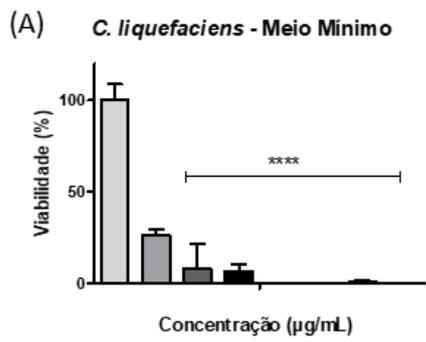


Figura 5: Análise de viabilidade em *Cryptococcus spp.* As espécies (a, b) *C. liquefaciens*, (c, d) *C. gattii* e (e, f) *C. neoformans* foram tratadas com concentrações de 0 a 125 µg/mL Ag/AgCl-NPs e após 48h tiveram sua viabilidade analisada pela técnica de UFC.

* P <0,05, ** P <0,01, *** P <0,001 (Anova Two-way).

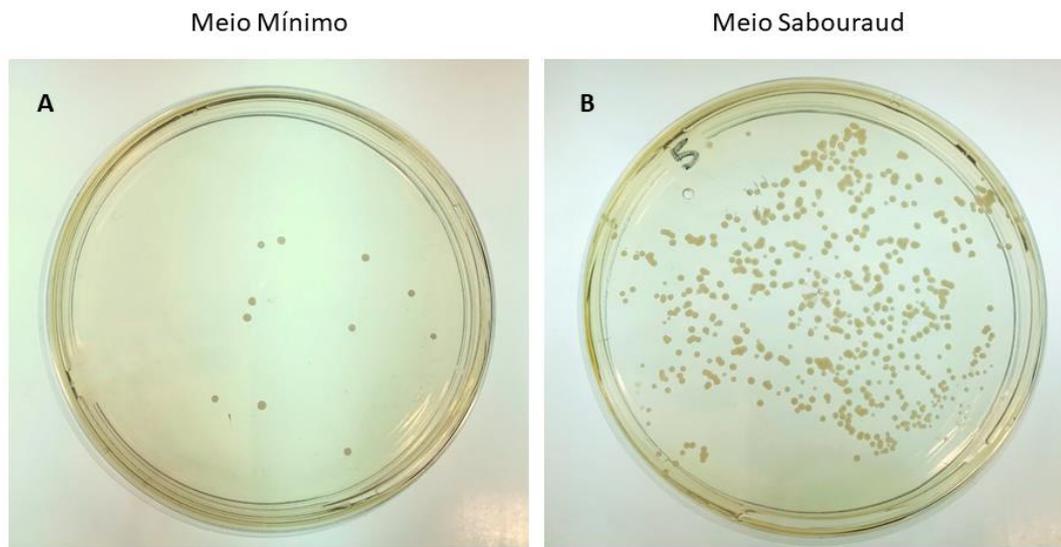


Figura 6. **Imagem representativa do ensaio de viabilidade pela técnica de UFC.** Em (a) *C. neoformans* após tratamento de 5 dias em meio mínimo na concentração de 5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs e em (b) Após tratamento de 5 dias em meio sabouraud na concentração de 5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs.

5.3 Contrastação com tinta Nanquim – Microscopia de Campo Claro

As leveduras foram contrastadas com coloração Nanquim, e posteriormente observadas em microscópio óptico de campo claro, possibilitando a visualização da cápsula das leveduras. Observando as imagens, notamos que o tamanho da cápsula se comportou de modo oposto após os tratamentos em meio mínimo e em meio Sabouraud. Em meio mínimo, ao serem tratadas na concentração de IC₅₀ de Ag/AgCl-NPs a espécie *C. gattii* teve um aumento de 19,15% da sua cápsula, já as espécies *C. liquefaciens* e *C. neoformans* tiveram uma redução de 28,07 e 28,43%, respectivamente. De modo oposto, em meio Sabouraud observamos uma redução de 53,1% da cápsula de *C. gattii*, enquanto as espécies *C. liquefaciens* e *C. neoformans* apresentaram o aumento de 19,78 e 19,55% da cápsula polissacarídica, respectivamente.

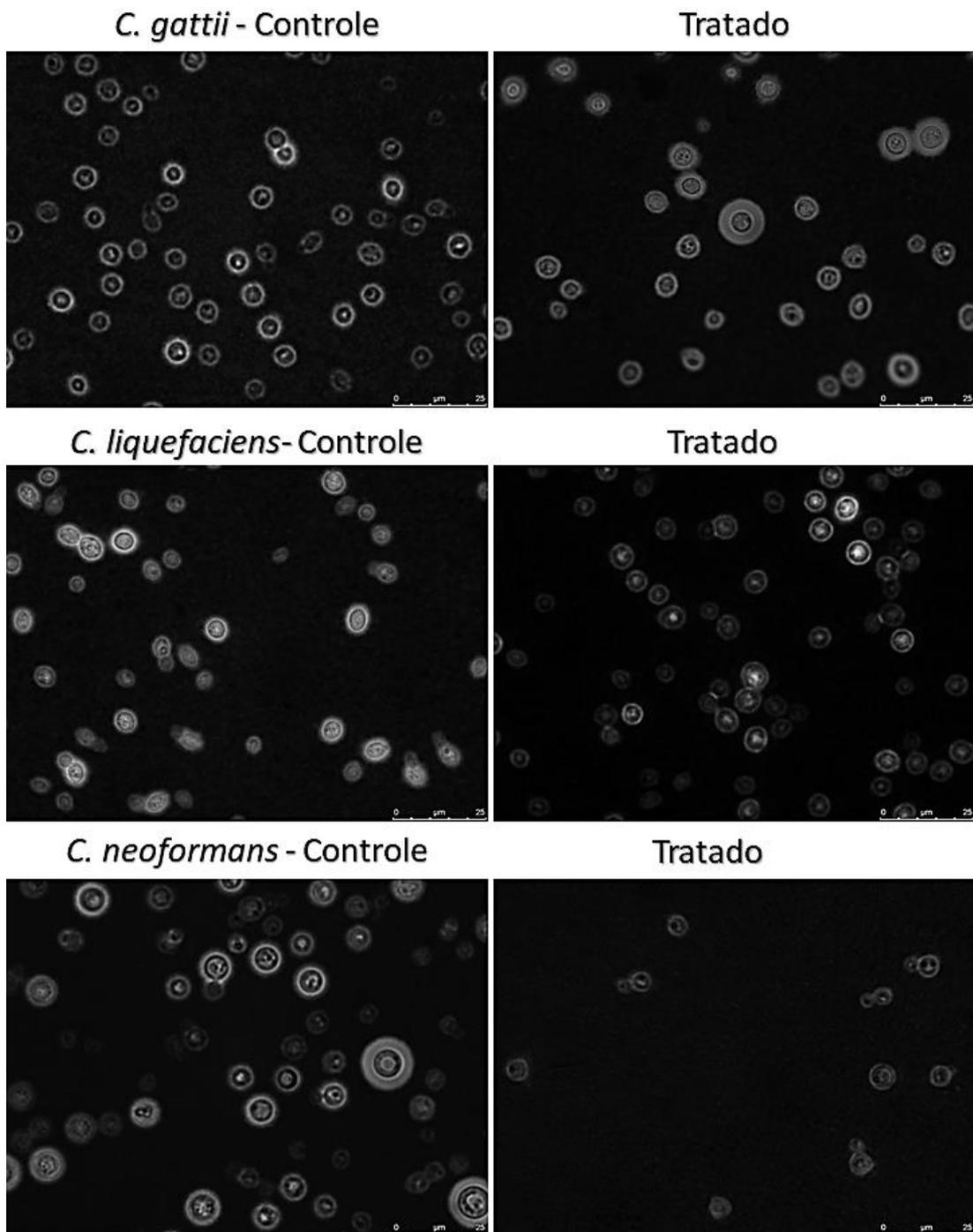


Figura 7. Imagens representativas de células de *Cryptococcus* spp. em meio mínimo contrastadas com tinta nanquim. Imagens realizadas com objetiva de 100x, em Microscópio óptico de campo claro.

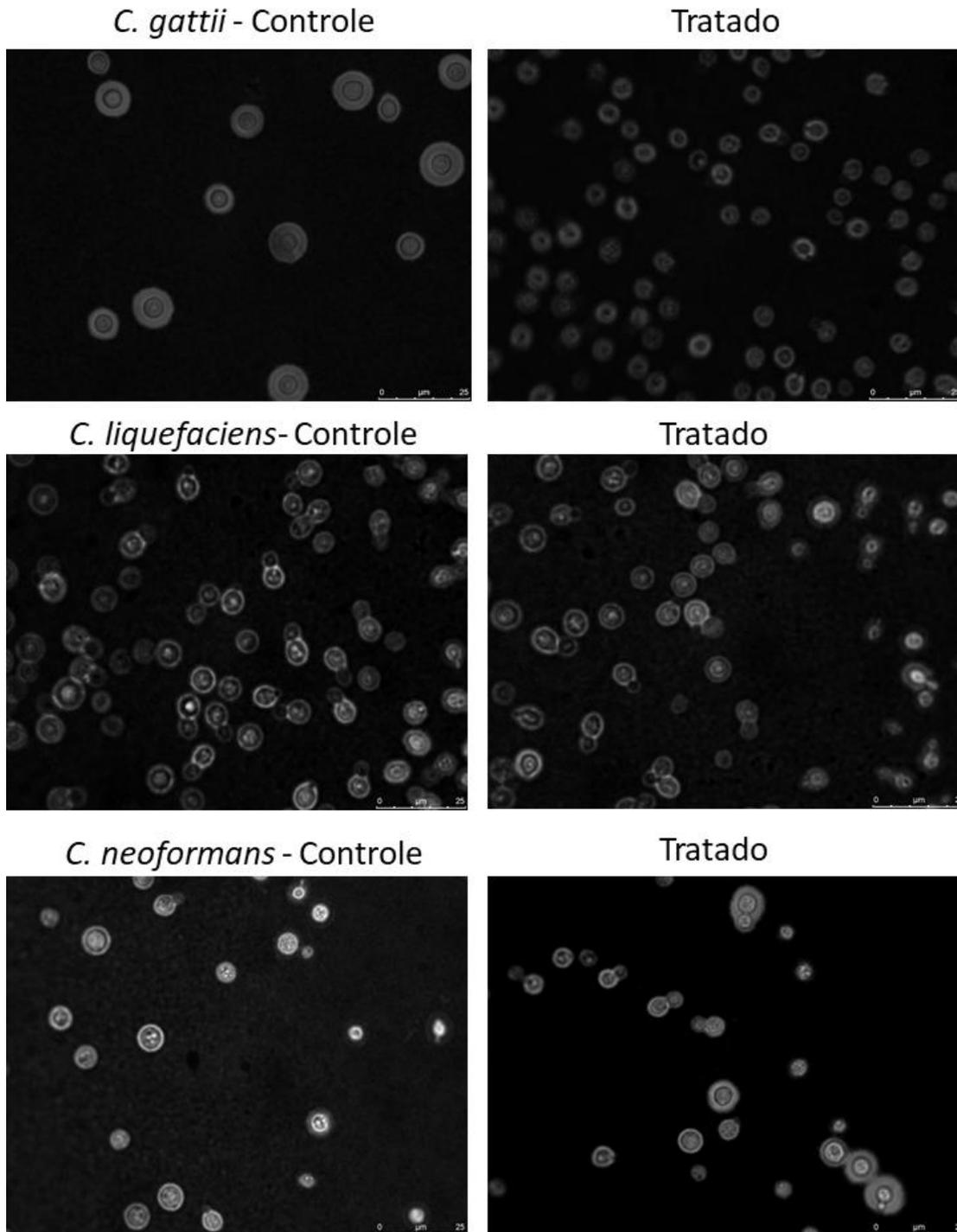


Figura 8. Imagens representativas de células de *Cryptococcus* spp. em meio Sabouraud contrastadas com tinta nanquim. Imagens realizadas com objetiva de 100x, em Microscópio óptico de campo claro.

Espécies	Controle (μm)	Tratado (μm)
<i>C. gattii</i>	1,321 \pm 0,288	1,574 \pm 0,682***
<i>C. liquefaciens</i>	1,297 \pm 0,418	0,933 \pm 0,190***
<i>C. neoformans</i>	1,400 \pm 0,585	1,002 \pm 0,249***

Tabela 2. Tabela contendo o tamanho da cápsula após os tratamentos em meio mínimo.

Valores obtidos através da medição de pelo menos 100 células por grupo. Os símbolos *P<0,05 ** P <0,01, e *** P <0,001 representam diferença estatística em relação ao controle.

Espécies	Controle (μm)	Tratado (μm)
<i>C. gattii</i>	2,132 \pm 0,709	1,039 \pm 0,227***
<i>C. liquefaciens</i>	0,915 \pm 0,288	1,096 \pm 0,607*
<i>C. neoformans</i>	1,043 \pm 0,355	1,247 \pm 0,570**

Tabela 3. Tabela contendo o tamanho da cápsula após os tratamentos em meio

Sabouraud. Valores obtidos através da medição de pelo menos 100 células por grupo. Os símbolos *P<0,05 ** P <0,01, e *** P <0,001 representam diferença estatística em relação ao controle.

5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

As leveduras em meio Sabouraud foram tratadas com Ag/AgCl- NPs na concentração de IC₅₀ de cada espécie, e após 72 h foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura. Através da análise ultraestrutural utilizando MEV, foi possível observar que as leveduras *C. liquefaciens* e *C. gattii* exibiram cápsulas ramificadas, características do gênero *Cryptococcus*. Já a espécie *C. neoformans*, exibiu uma cápsula com tamanho menor que as demais espécies. As ramificações encontradas em *Cryptococcus spp.* eram compostas por fibras de diferentes comprimentos, que interagem com as fibras das demais leveduras que estavam próximas.

Ao serem tratadas com as Ag/AgCl-NPs, foi possível observar que além de apresentarem uma redução do número de células, as leveduras tratadas mostraram uma tendência de perda da cápsula polissacarídica que envolve a célula. A cápsula polissacarídica quando presente nas leveduras tratadas com Ag/AgCl-NPs, apresentaram-se em comprimento e quantidade reduzidos.

Utilizando a difração de elétrons retroespalhados, foi possível observar a localização das NPs nas culturas tratadas. Observamos ausência de NPs na cápsula polissacarídica nas três espécies estudadas neste trabalho. As NPs foram encontradas apenas na superfície das leveduras. Além disso, apesar das leveduras estarem em contato físico, as NPs não foram encontradas em todas as leveduras das culturas tratadas.

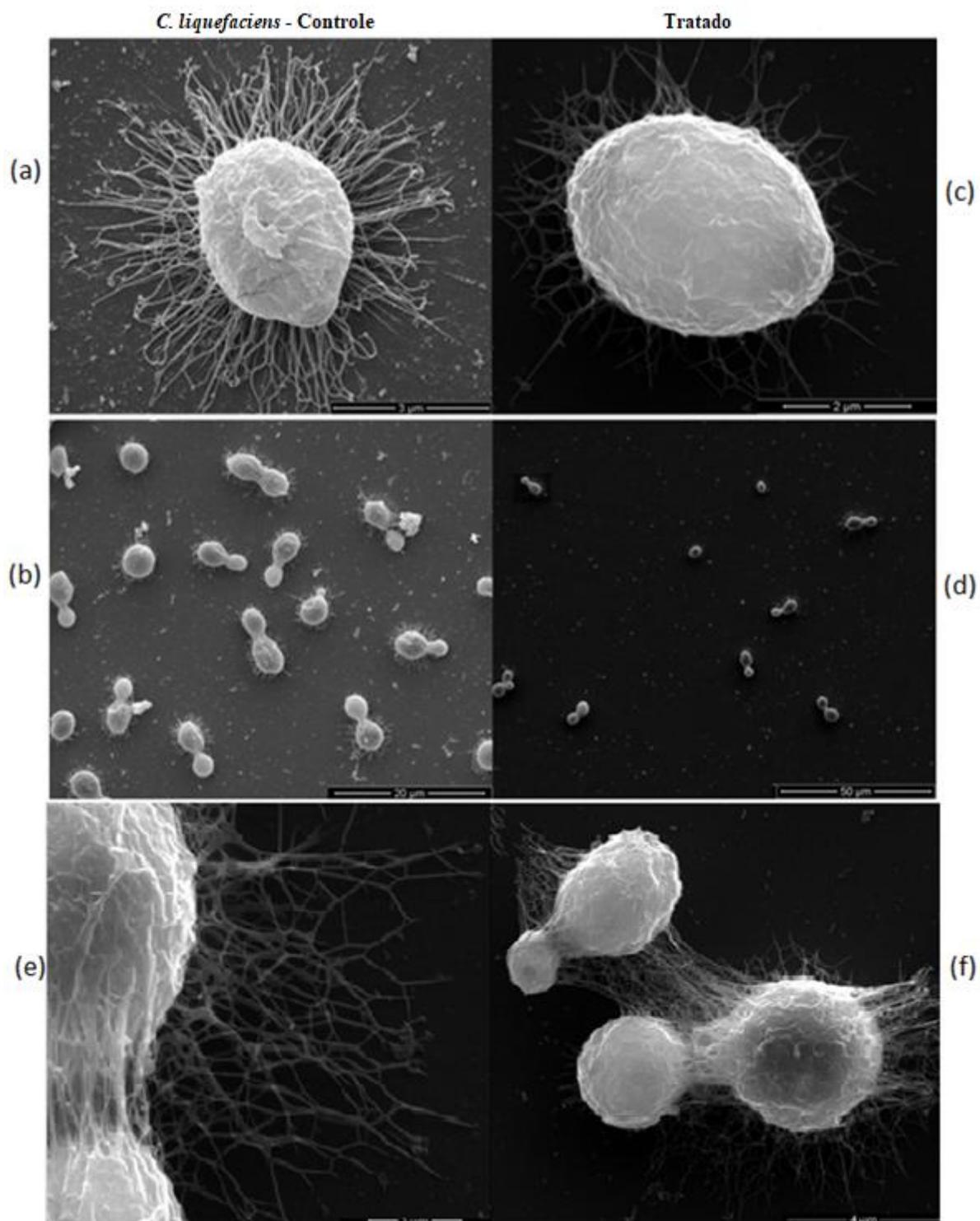


Figura 9. Imagens representativas de *C. liquefaciens* em MEV. (a),(b) e (e) representam *C. liquefaciens* na condição controle e (c), (d) e (f) representam *C. liquefaciens* após 72 h de tratamento com Ag/AgCl-NPs na contração de IC₅₀.

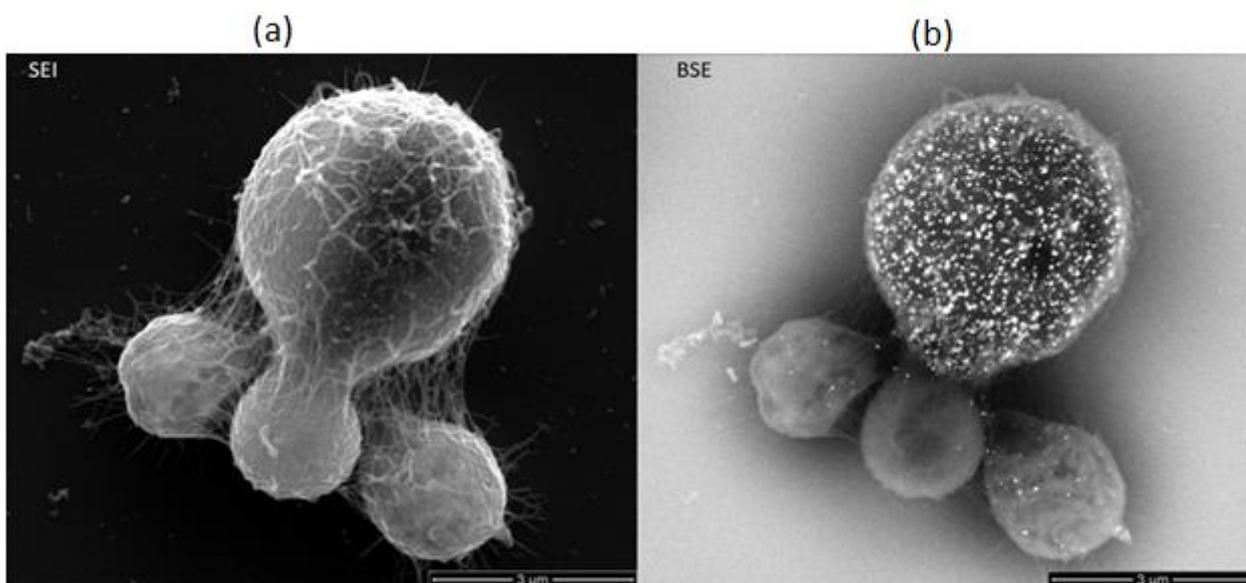


Figura 10. Imagens representativas em MEV de *C. liquefaciens* tratadas com Ag/AgCl-NP na concentração de IC₅₀ em 3 dias. Em (a) elétrons secundários, e em (b) elétrons retroespalhados. Os pontos brilhantes representam as NPs observadas utilizando elétrons retroespalhados.

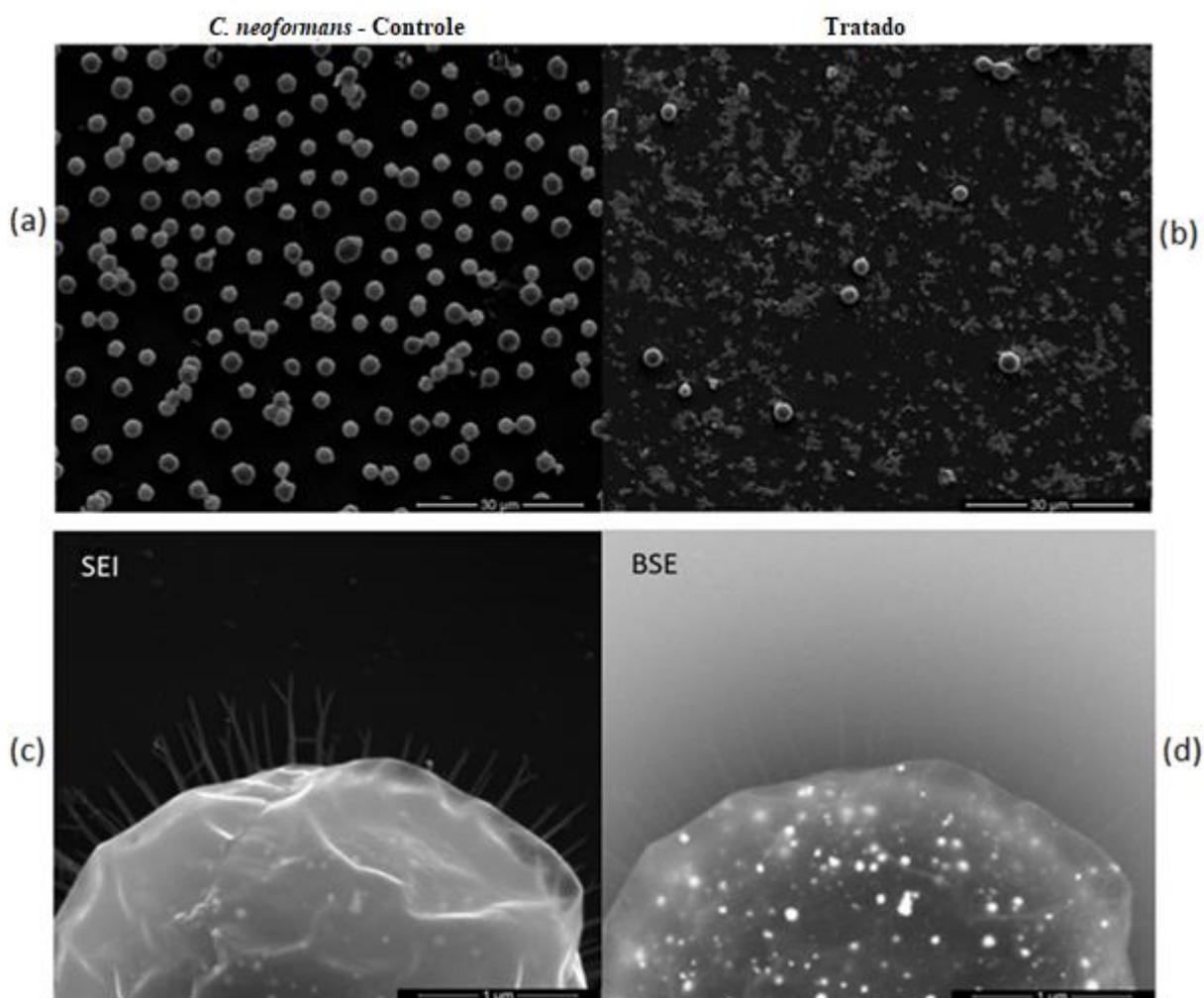


Figura 11. Imagens representativas em MEV de *C. neoformans*. Em (a) e (c) observamos *C. neoformans* na condição controle e em (b) e (d) observamos *C. neoformans* tratadas com Ag/AgCl-NP na concentração de IC₅₀ em 3 dias. Os pontos brilhantes representam as NPs observadas utilizando elétrons retroespalhados.

5.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Após 72 h de tratamento das leveduras em meio Sabouraud com Ag/AgCl-NP na concentração de IC₅₀, observamos através da microscopia eletrônica de transmissão uma grande quantidade de aglomerados de NPs tanto no interior das leveduras como na parte exterior, fato que pode ser responsável por causar danos graves ou morte de células criptocócicas.

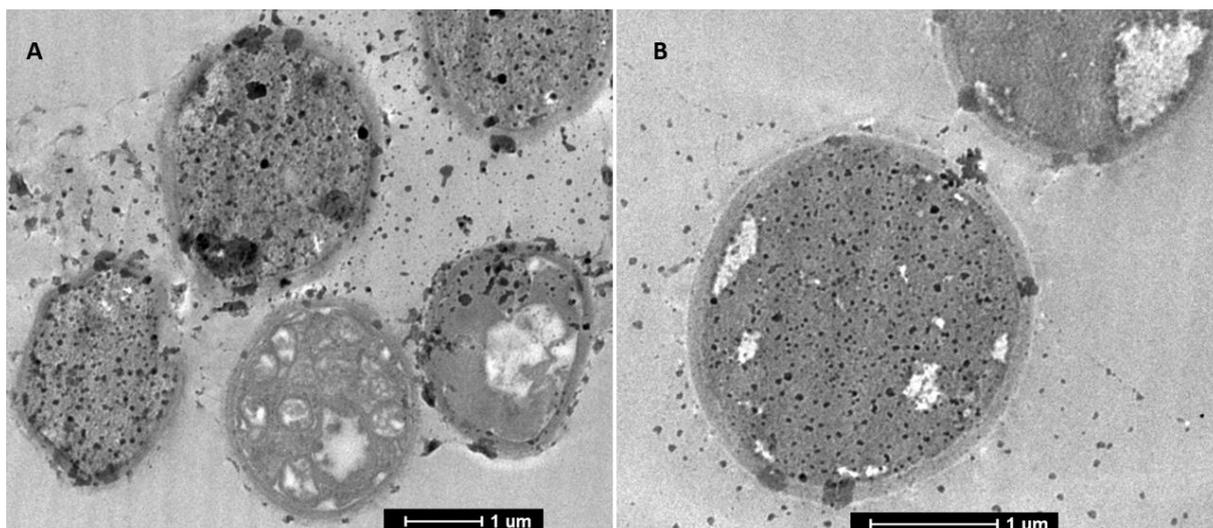


Figura 12. Imagens representativas em MET de *C. liquefaciens* após 3 dias de tratamento com Ag/AgCl-NPs.

6. Discussão

A prata (Ag^+) vem sendo estudada durante muitas décadas, principalmente pelos seus notáveis efeitos biocidas. Sabe-se que a prata e seus compostos possuem forte atividade inibitória, assim como um amplo espectro de atividades antimicrobianas para bactérias, fungos e vírus (SILVER, 2003; LOK *et al.*, 2006; CHO *et al.*, 2005). Em comparação com outros metais, a prata apresenta maior toxicidade para micro-organismos, enquanto exibe menor toxicidade para células de mamíferos (ZHAO e STEVENS, 1998). Atualmente, muitos produtos do cotidiano utilizam as nanopartículas de prata (AgNPs) devido a sua ação antimicrobiana. Dentre esses produtos, podem ser citados os refrigeradores, celulares, roupas, curativos, cremes dentais e cosméticos (CHERNOUSOVA e EPPLE, 2013). Cabe destacar que as nanopartículas metálicas vêm se mostrando uma alternativa promissora na área biomédica, pois seu amplo espectro biocida vem como uma possível solução para a resistência dos micro-organismos aos íons metálicos e aos antibióticos (RAI *et al.*, 2009).

Nanopartículas a base de prata, como as de cloreto de prata (AgCl-NPs) e a de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl-NPs) são menos exploradas e necessitam de mais estudos, pois possuem grande potencial biomédico por possuírem a prata como componente, compartilhando dessa forma as características antimicrobianas das AgNPs. Para a realização deste trabalho foram utilizadas nanopartículas de Ag/AgCl-NPs de origem biológica, previamente descritas pelo grupo (EUGENIO *et al.*, 2016). O presente estudo investigou a resposta da interação entre

Ag/AgCl-NPs e leveduras do gênero *Cryptococcus spp.* Inicialmente, as Ag/AgCl-NPs biossintetizadas pela levedura *C. intermedia* foram analisadas quanto à sua atividade antiproliferativa contra as leveduras *C. neoformans*, *C. gattii* e *C. liquefaciens* (Figura 4). O ensaio antiproliferativo nos revelou que os tratamentos com as Ag/AgCl-NPs foram dose-dependentes, possuindo efeito inibitório significativo a partir de 1 µg/mL em meio mínimo para as três espécies em 3 dias, a partir de 5 µg/mL em meio sabouraud para *C. liquefaciens* e *C. gattii*, e a partir de 25 µg/mL para *C. neoformans*. Foi investigado se o tratamento com as Ag/AgCl-NPs afetariam a viabilidade das culturas das leveduras (Figura 5). Os resultados mostraram que em meio mínimo todas as concentrações de Ag/AgCl-NPs afetaram significativamente a viabilidade celular das três espécies. Já em meio sabouraud, a viabilidade foi afetada a partir de 75 µg/mL para *C. liquefaciens*, a partir de 5 µg/mL para *C. gattii*, e a partir de 50 µg/mL para *C. neoformans*. Nossos resultados mostraram que *C. neoformans* foi menos suscetível ao tratamento com as Ag/AgCl-NPs. Semelhante aos nossos resultados, estudos de RÓNAVÁRI *et al.*, 2006 demonstraram que tratamentos com AgNPs para *C. neoformans*, utilizando o método de UFC em concentrações de 17,5; 70; 175; 350; e 1750 µg/mL por 24 h, resultaram em um efeito antiproliferativo dose-dependente; além disso, os tratamentos com AgNP resultaram em completa perda de viabilidade, mesmo na menor concentração testada. ISHIDA *et al.*, 2013 demonstraram que as espécies *C. gattii* e *C. neoformans* eram ligeiramente mais suscetíveis ao tratamento com AgNPs (MICs de 0,42-0,84 µg/mL) do que leveduras do gênero *Candida spp.* (MICs de 0,84-1,68 µg/mL). TANG *et al.*, 2018 após um screening com concentrações de 0 a 400 µg/mL de PLGA-NPs encontraram um MIC de 10 µg/mL para *C. neoformans*. Em estudo de WANG *et al.*, os MICs de nanopartículas peptídicas (CG₃R₆TAT) contra *C. neoformans* foram testados, variando de 1,0 a 8,1 mmol/L. RONAVARI *et al.*, 2017 avaliaram o efeito de AgNPs e AuNP contra os fungos dermatófitos *C. neoformans*, *Microsporum gypseum*, *Candida spp.* e *Trichophyton spp.*; e os resultados mostraram que AgNPs na concentração de 30 µg/mL inibiram cerca de 80% do crescimento celular desses fungos, porém quando expostos a AuNPs apenas *C. neoformans* foi suscetível. A viabilidade celular para *C. neoformans* foi determinada usando o ensaio de UFC, e tratamentos com 1 µg/mL de AgNPs ou AuNPs já resultaram em uma perda significativa da viabilidade celular, semelhante aos resultados do presente trabalho.

As leveduras foram cultivadas nas mesmas condições, e após 5 dias de tratamento com as Ag/AgCl-NPs na concentração de IC₅₀ foram analisadas em microscopia de campo claro (figuras 7 e 8) e microscopia eletrônica de varredura (figuras 9, 10 e 11); a fim de investigar

mudanças estruturais em *Cryptococcus* spp. após o tratamento com as NPs, incluindo possíveis mudanças na cápsula polissacarídica. A maioria dos estudos sobre a cápsula foram realizados em *C. neoformans*, devido ao potencial patogênico relativamente baixo de outras espécies do gênero (ARAÚJO *et al.*, 2017). A cápsula de *Cryptococcus* spp. é considerada o fator mais importante associado à virulência desse micro-organismo (OMEARA e ALSPAUGH, 2012). Estudos sobre cepas não patogênicas são importantes, visto que estas podem emergir como novos agentes causadores da doença devido a aquisição da termotolerância às temperaturas dos mamíferos, o que pode ser facilitado pela problemática do aquecimento global. Além disso, os patógenos emergentes podem não ser sensíveis aos antifúngicos disponíveis, potencializando a ameaça de novas doenças fúngicas (ARAÚJO *et al.*, 2017).

A técnica de contrastação com Nanquim é um método de fácil visualização da cápsula de leveduras do gênero *Cryptococcus*, que se tornam mais evidentes contra o fundo preto proporcionado pela tinta. Após contrastar as leveduras com coloração Nanquim e observar as imagens em microscopia óptica de campo claro, notamos que o tamanho da cápsula se comportou de modo oposto após os tratamentos em meio mínimo e em meio Sabouraud. Em meio mínimo, ao serem tratadas na concentração de IC₅₀ de Ag/AgCl- NPs a espécie *C. gattii* teve um aumento de 19,15% de sua cápsula, já as espécies *C. liquefaciens* e *C. neoformans* tiveram uma redução de 28,07 e 28,43%, respectivamente, como pode ser observado na tabela 2. De modo oposto, em meio Sabouraud observamos uma aparente redução da cápsula de *C. gattii* (53,1%), enquanto as espécies *C. liquefaciens* e *C. neoformans* apresentaram um aumento de 19,78 e 19,55% da cápsula polissacarídica (tabela 3). Quando observadas por MEV, ambas as células de levedura *C. liquefaciens*, e *C. gattii* apresentaram cápsulas ramificadas, mostrando fibras polissacarídicas ramificadas com diferentes comprimentos. ARAÚJO *et al.*, 2017 descreveram as ramificações fibrilares como uma rede heterogênea semelhante a microgel; assimétrica de alta complexidade estrutural, de forma que as fibras interagem umas com as outras; tal interação pode ser observado na Figura 9f. Já a espécie *C. neoformans* apresentou uma cápsula polissacarídica de tamanho pequeno. De acordo com CASADEVALL *et al.*, 2019 a relação entre o tamanho da cápsula da cepa e a virulência, se houver, permanece incerta, pois diferentes estudos produziram resultados conflitantes.

Após o tratamento de 3 dias com as Ag/AgCl- NPs, observamos através de MEV uma notável redução do número de células, além de uma tendência de perda da cápsula polissacarídica que envolve as células (figuras 9, 10 e 11). A cápsula polissacarídica quando presente nas leveduras tratadas com Ag/AgCl-NPs, apresentaram-se em comprimento e

quantidade reduzidos. Utilizando a difração de elétrons retroespalhados, foi possível observar a localização das nanopartículas nas culturas tratadas. Observamos ausência de NPs na cápsula polissacarídica (Figura 11d) das três espécies estudadas neste trabalho, e as NPs foram encontradas apenas na superfície das leveduras. Além disso, apesar das leveduras estarem em contato direto umas com as outras, as NPs não estavam presentes em todas as leveduras das culturas tratadas (Figura 10b). ARAÚJO *et al.*, 2017 demonstraram semelhanças notáveis na ultraestrutura e virulência da cápsula, entre isolados de *C. neoformans* e *C. liquefaciens*, além de encontrarem semelhanças na composição e estrutura entre as moléculas de PS (capsular e secretada). Em nosso trabalho encontramos semelhanças entre as espécies *C. liquefaciens* e *C. gattii*, que apresentaram respostas similares quanto ao efeito antiproliferativo, resultando em um IC₅₀ muito próximo.

As imagens de MET mostram que as NPs conseguem chegar no interior das leveduras, como pode ser observado na figura 12. Encontramos aglomerados de NPs tanto no interior, como no exterior das leveduras, semelhante aos trabalhos encontrados na literatura. Em estudos de VAZQUEZ-MUNOZ *et al.*, 2014 após tratar *C. albicans* com AgNPs foi encontrado agregação de NPs fora das células fúngicas, sugerindo a liberação de íons de prata que seriam responsáveis por induzir a morte celular através do processo de redução resultante da interação dos componentes celulares com a prata iônica. ZHANG *et al.*, 2016 trataram *C. neoformans* com Pd-AgNPs e observaram que a maioria das células tratadas parecia altamente deformadas e era cercada por NPs aglomeradas, indicando danos graves ou morte de células criptocócicas causadas por Pd-AgNPs. Além disso, foi observado alterações na estrutura da parede celular, possuindo um arranjo frouxo e desordenado; e em algumas células foi evidente a separação da parede celular da membrana interna e da cápsula externa. ZHANG *et al.*, 2016 observaram um aumento pronunciado no número de vacúolos e mitocôndrias, além da redução da densidade do ribossomo livre e do citoplasma, e sugeriram um desequilíbrio na síntese e transporte de proteínas, além de interrupção do metabolismo energético. WANG *et al.*, 2009 também observaram quebra da parede celular, alterações vacuolares e liberação do citoplasma em *C. neoformans*, após tratamento de 2 h com NPs peptídicas (CG₃R₆TAT). GUERRA *et al.*, 2012 mostraram que tratamentos com antifúngicos incluindo Fluconazol e Anfotericina B causaram danos celulares em *C. neoformans*, incluindo um aumento no número de vacúolos citoplasmáticos, descolamento da membrana da parede celular, inchaço mitocondrial, e ruptura da parede celular. Em estudo de KASEMETS *et al.*, 2019 a levedura *Saccharomyces cerevisia* foi exposta a AgNPs e a análise de MET revelou a adsorção de grânulos densos de NPs na

superfície das células e a sua localização intracelular. Além disso, pequenas vesículas foram vistas nas células de leveduras expostas a AgNPs; de acordo com LI e KANE (2009) o aumento de vacúolos é uma característica de resposta celular das leveduras ao estresse iônico.

Em resumo, nossos resultados confirmam o excelente desempenho antifúngico *in vitro* de Ag/AgCl-NPs produzidas biologicamente, uma vez que afetam viabilidade e proliferação das espécies *C. liquefaciens*, *C. gattii* e *C. neoformans*, podendo no futuro serem exploradas para novos tratamentos de infecções fúngicas, necessitando dessa forma de mais estudos para mostrar a citotoxicidade em células de mamíferos para garantir o seu uso seguro e compreender o mecanismo pelo qual as NPs conseguem interagir com *Cryptococcus* spp.

7. Conclusões

- Ag/AgCl-NPs produzidas biologicamente possuem forte efeito antifúngico contra *Cryptococcus* spp., possuindo resposta dose-dependente e sendo mais pronunciado em meio mínimo;
- Em meio mínimo a viabilidade foi afetada em todas as concentrações de Ag/AgCl-NPs para as três espécies, já em meio sabouraud, a viabilidade foi afetada a partir de 75 µg/mL para *C. liquefaciens*, a partir de 5 µg/mL para *C. gattii*, e a partir de 50 µg/mL para *C. neoformans*.
- A espécie mais sensível ao tratamento foi *C. liquefaciens* e a menos sensível foi *C. neoformans*;
- Em meio enriquecido, *C. gattii* exibiu uma cápsula de maior espessura que as demais espécies;
- As NPs marcaram intensamente algumas células, e não encontramos marcação de NPs na cápsula de nenhuma das espécies neste trabalho;
- Além disso, essas NPs são capazes de chegar no interior das leveduras apesar da agregação encontrada, que pode estar associada com a liberação de íons de prata e, assim, induzindo a morte celular através do processo de redução resultante da interação dos componentes celulares com a prata iônica.

8. Referências Bibliográficas

AHMED S.; AHMAD M.; SWAMI B. L.; IKRAM S. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise. **J. Adv. Res.** v. 7, p. 17–28, 2016.

ALANIO A.; VERNEL-PAUILLAC F.; STURNY-LECLERE A.; DROMER F. *Cryptococcus neoformans* host adaptation: toward biological evidence of dormancy. **mBio**, v. 6, n. 2, p. 1-13, 2015.

ALLEN T.M., CULLIS P.R. Drug delivery systems: entering the mainstream. **Science**. v. 303, n. 5665, p. 1818-22, 2004.

ALSPAUGH J.A. Virulence Mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Fungal Genet Biol.** 78: 55–58, 2015

ARAUJO G.D.S., FONSECA F.L., PONTES B., TORRES A., CORDERO R.J.B., ZANCOPE-OLIVEIRA R.M., CASADEVALL A., VIANA N.B., NIMRICHTER L., RODRIGUES M.L., GARCIA E.S., DE SOUZA W., FRASES S. 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, 2012.

ARAUJO G.R.S., FREITAS G.J.C., FONSECA F.L., LEITE P.E.C., ROCHA G.M., DE SOUZA W., SANTOS D.A., FRASES S. The environmental yeast *Cryptococcus liquefaciens* produces capsular and secreted polysaccharides with similar pathogenic properties to those of *C. neoformans*. **Scientific Reports**, v.7, n. 1, p. 1-12, 2017.

BALTAZAR L.M.; RIBEIRO M.A. Primeiro isolamento ambiental de *Cryptococcus gattii* no Estado do Espírito Santo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, n.5, p.449- 453, 2008.

BARANWAL A., MAHATO K., SRIVASTAVA A., MAURYA P. K., CHANDRA P. Phytofabricated metallic nanoparticles and their clinical applications. **RSC Advances**. v. 6, n. 107, p. 105996–106010, 2016.

BARANWAL A., SRIVASTAVA A., KUMAR P., BAJPAI V.K., MAURYA P.K., CHANDRA P. Prospects of Nanostructure Materials and Their Composites as Antimicrobial Agents. **Front. Microbiol.** V.9, p. 422, 2018.

BASTOS R.M.P.. Nanotecnologia: Uma revolução no desenvolvimento de novos produtos. Monografia, **Universidade Federal de Juiz de Fora**, Coordenação de Curso de Engenharia de Produção, 2006.

BERGMAN F. Studies on capsule synthesis of *Cryptococcus neoformans*. **Sabouraudia** v.4, p. 23–31, 1965.

BEYTH N., HOURI-HADDAD Y., DOMB A., KHAN W., HAZAN R. Alternative antimicrobial approach: nano-antimicrobial materials. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, p. 1–16, 2015.

BEYTH N., HOURI-HADDAD, DOMB Y., KHAN A., HAZAN W., R. Alternative antimicrobial approach: nano-antimicrobial materials. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* p. 1–16, 2015.

BOLANOS B., MITCHELL T. G. Killing of *Cryptococcus neoformans* by rat alveolar macrophages. **J. Med. Vet. Mycol.** v. 27, p. 219–228, 1989.

CASADEVALL A., COELHO C., CORDERO R. J. B., DRAGOTAKES Q., JUNG E., VIJ R., WEAR M.P., The capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Virulence**, v. 10, n.1, p. 822-831, 2019.

CASTRO V.F. Sistemas híbridos nanoestruturados com potenciais aplicações na terapia e diagnóstico do câncer. Dissertação de Mestrado, **Universidade Federal de Itajubá**, 2012.

CHANG Y. C., KWON-CHUNG K. J. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. **Mol. Cell. Biol.** V. 14, p. 4912–4919, 1994.

CHAU C.F.; WU S.H.; YEN G.C. The development of regulations for food nanotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, , v. 18, n. 5, p. 269-280, 2007.

CHO K.H., PARK J.E., OSAKA T., PARK S.G. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. **Electrochim Acta**, v.51, p. 956–960, 2005.

COELHO C., BOCCA A. L., CASADEVALL A. The tools for virulence of *Cryptococcus neoformans*. Adv. **Appl. Microbiol.** V.87, p. 1–41, 2014.

RODAZ-RODRIGUEZ L., DÍAZ-PAZ M., PALACIOS-RIVERA H., FIRACATIVE C., MEYER W., ALCÁZAR-CASTILHO M., Fatal case of polymicrobial meningitis caused by *Cryptococcus liquefaciens* and *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 8, p. 2753-2755, 2015.

CRUICKSHANK J. G., CAVILL R., JELBERT M. *Cryptococcus neoformans* of unusual morphology. **Appl. Microbiol.** V.25, p. 309–312, 1973.

DAKAL T. C., KUMAR A., MAJUMDAR R. S., YADAV V. Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. **Front. Microbiol.** v. 7, p. 1-17, 2016.

DARZÉ C.; LUCENA R.; GOMES I.; MELO A. Características clínicas laboratoriais de 104 casos de meningoencefalite criptocócica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.33, n.1, p.21-26, 2000.

DASTJERDI R., MONTAZER M. A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: focus on anti-microbial properties. **Colloids Surf.** V. 79, p. 5–18, 2010.

DEL POETA M., TOFFALETTI D.L., RUDE T.H., SPARKS S.D, HEITMAN J., PERFECT J.R. *Cryptococcus neoformans* differential gene expression detected in vitro and in vivo with green fluorescent protein. **Infect. Immun.** v. 67, p. 1812–20, 1999.

DOERING T.L. How does *Cryptococcus* get its coat? **Trends Microbiol.** V. 8, p. 547–553, 2000.

DUNCAN T. V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: barrier materials, antimicrobials and sensors. **J. Colloid Interface Sci.** V. 363, p. 1–24, 2011.

DURÁN, N., CUEVAS, R., CORDI, L., RUBILAR, O. & DIEZ, M.C. Biogenic silver nanoparticles associated with silver chloride nanoparticles (Ag/AgCl) produced by laccase from *Trametes versicolor*. **SpringerPlus**, v. 3, p. 645, 2014.

DURÁN, N., MARCATO, P.D., CONTI, R.D., ALVES, O.L., COSTA, F.T.M. & BROCCHI, M. Potential Use of Silver Nanoparticles on Pathogenic Bacteria, their Toxicity and Possible Mechanisms of Action. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.21, n.6, p. 949-959, 2010.

DURSKI K. N. *et al.* Cost-effective diagnostic checklists for meningitis in resource-limited settings. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.** V. 63, p. 101–108, 2013.

ELLIS D.H.; PFEIFFER T.J. Natural Habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, n.7, p.1642-1644, 1990.

ENOCHS W. S., NILGES M. J., SWARTZ H. M. A standardized test for the identification and characterization of melanins using electron paramagnetic (EPR) spectroscopy. **Pigment Cell Res.** v.6, p. 91–99, 1993.

EUGENIO, M., MULLER, N., FRASES, S., ALMEIDA-PAES, R., LIMA, L.M.T.R., LEMGRUBER, L., FARINA, M., DE SOUZA, W. & SANT'ANNA, C. Yeast-derived biosynthesis of silver/silver chloride nanoparticles and their antiproliferative activity against bacteria. **RSC Advances**, v. 6, p. 9893-9904, 2016.

EUGENIO M.F.C. Avaliação do efeito antibacteriano e antitumoral de nanopartículas de prata/cloreto de prata produzidas por rota verde a partir de leveduras. Dissertação de Mestrado

– Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional. **UNIGRANRIO/INMETRO/UEZO**, 2017.

FAKRUDDIN M.D., HOSSAIN ZAKIR, AFROZ HAFSA. Prospects and applications of nanobiotechnology: a medical perspective. **J Nanobiotechnology**; p. 10-31, 2012.

FARHI F., BULMER G. S., TACKER J. R. Cryptococcus neoformans: the not-so-encapsulated yeast. **Infect. Immun.** v.1, p. 526–531, 1970.

FARIA R.O.; NASCENTE P.S.; MEINERZ A.R.M.; CLEFF M.B.; ANTUNES T.A.; SILVEIRA É.S.; NOBRE M.O.; MEIRELES M.C.A.; MELLO J.R.B. Ocorrência de Cryptococcus neoformans em excretas de pombos na Cidade de Pelotas, Estado do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, n.2, p.198-200, 2010.

FELDMESSE M., KRESS Y., CASADEVALL A. Dynamic changes in the morphology of Cryptococcus neoformans during murine pulmonary infection. **Microbiology**, v.147, p. 2355–2365, 2001.

FERREIRA V.D.S. Avaliação do potencial antifúngico, antitumoral e toxicidade ambiental de nanopartículas a base de prata. Relatório de Qualificação de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional. **UNIGRANRIO/INMETRO/UEZO**, 2017.

FEYNMAN R.P. *There's Plenty of Room at the Bottom*. **Engineering and Science**, v.23, n. 5, p. 22-36, 1960.

FISHER M. C. *et al.* Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. **Nature**, v.484, p.186–194, 2012.

FRASES S., PONTES B., NIMRICHTER L., RODRIGUES M.L., VIANA N.B., CASADEVALL A. The Elastic Properties of the Cryptococcus neoformans Capsule. **Biophys J**; v.97, n.4, p. 937–945, 2009.

GABUZDA, D. H.; HIRSCH, M. S., 1987. Neurologic Manifestations of Infection with Human Immunodeficiency Virus. **Annals of Internal Medicine**, v. 107, p.383-391, 1987.

GIACOMAZZI J. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, v.59, p. 145-150, 2016.

GOLDMAN DL, *et al.*, Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early childhood. **Pediatrics** v. 107, p. 66, 2001.

GUERRA C. R., ISHIDA K., NUCCI M., ROZENTAL S., Terbinafine inhibits *Cryptococcus neoformans* growth and modulates fungal morphology, **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 5, p. 582-590, 2012.

HILL Z. H. The function of melanin or six blind people examine an elephant. **BioEssays**, v. 14, p.49–56, 1992.

ISHIDA K., CIPRIANO T.F., ROCHA G.M., WEISSMULLER G., GOMES F., MIRANDA K., ROZENTAL S., Silver nanoparticle production by the fungus *Fusarium oxysporum*: Nanoparticle characterisation and analysis of antifungal activity against pathogenic yeasts. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, V. 109, n. 2, p. 220-228, 2014.

JARVIS J. N. *et al.*, Adult meningitis in a setting of high HIV and TB prevalence: findings from 4961 suspected cases. **BMC Infect. Dis.** V. 10, p. 67, 2010.

KASEMETS K., KAOSAAR S., VIJA H., FASCIO U., MANTECCA P., Toxicity of differently sized and charged silver nanoparticles to yeast *Saccharomyces cerevisiae* BY4741: a nano-biointeraction perspective. **Nanotoxicology**, v. 13, n.8, p. 1041-1059, 2019.

KATAS K., MODEN N.Z., LIM C.S., CELESISTINUS T., CHAN J.Y., GANASAN P., ABDALLA S.S.I. Biosynthesis and Potential Applications of Silver and Gold Nanoparticles and Their Chitosan-Based Nanocomposites in Nanomedicine. **Journal of Nanotechnology**, 2018.

KAUR P., THAKUR R., CHAYDHURY A. Biogenesis of copper nanoparticles using peel extract of *Punica granatum* and their antimicrobial activity against opportunistic pathogens. **Journal of Green Chemistry: Review Letters**, v.9, n. 1, p. 33-38, 2016.

KHOT L. R., SANKARAN S., MAJA J. M., EHSANI R., SCHUSTER E. W. Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: a review. **Crop Prot.** v. 35, p. 64–70, 2012.

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

KOZEL T. R., GOTSCHLICH E. C. The capsule of *Cryptococcus neoformans* passively inhibits phagocytosis of the yeast by macrophages. **J. Immunol.** V. 129, p. 1675–1680, 1982.

KOZEL T. R., PFROMMER G. S., GUERLAIN A. S., HIGHISON B. A., HIGHISON G. J. Strain variation in phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*: dissociation of susceptibility to phagocytosis from activation and binding of opsonic fragments of C3. **Infect. Immun.** v. 56, p. 2794–2800, 1988.

KOZEL T.R. Virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. **Trends in Microbiology.** V. 3, p. 295-298, 1995.

KRUMOV N., PERNER-NOCHTA I., ODER S., GOTCHEVA V., ANGELOV A., POSTEN C. Production of Inorganic Nanoparticles by Microorganisms. **Chem. Eng. Technol.** V. 32, n. 7, p. 1026–1035, 2009.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E.; THEODORE, T. S. *Cryptococcus bacillisporus* sp. nov.: Serotype B-C of *Cryptococcus neoformans*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 28, n.4, p. 616- 620, 1978.

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHECK, I.; BENNETT, J. E. Improved Diagnostic Medium for Separation of *Cryptococcus neoformans* var. *Neoformans* (Serotypes A and D) and

Cryptococcus neoformans var. *gattii* (Serotypes B and C). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 15 n. 3, p. 535-537, 1982.

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

LAURENT S, FORGE D, PORT M, ROCH A, ROBIC C, VANDER E.L, MULLER RN. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications, **Chem Rev.** V.108, n.6, p.2064-2110, 2010.

LEVY, R. M.; BREDESEN, D. E.; ROSENBLUM, M. L. Neurological manifestations of the acquired immuno-deficiency syndrome (AIDS): Experience at UCSF and review of the literature. **J. Neurosurg**, v. 62, p. 475- 495, 1985.

LI Q., MAHENDRA S., LYON D. Y., BRUNET L., LIGA M.V., LI, D. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. **Water Res.** v.42, p. 4591–4602, 2008.

LIMA C.T., *et al.* *Cryptococcus* spp. em excretas de *Columba livia* (pombos domésticos) provenientes de um hospital universitário no Sul do Brasil . **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.82, p.1-4, 2015.

LIN X., HEITMANN J. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex **Annu. Rev. Microbiol.** V.60, p. 69–105, 2006.

LITTMAN M. Capsule synthesis by *Cryptococcus neoformans*. **Trans. N. Y. Acad. Sci.** V.20, p.623–648, 1958.

LOK C.N., HO C.M., CHEN R., HE Q.Y., YU W.Y., SUN H., TAM P.K., CHIU, J.F., CHEN C.M. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. **J. Proteome. Res.**, v. 5, p. 916–924, 2006.

LOVE G. L., BOYD G. D., GREER D. L. Large *Cryptococcus neoformans* isolated from brain abscess. **J. Clin. Microbiol.** V.22, p.1068–1070, 1985.

MAEDA T. A remedy for the temperature recovering method of solidification simulation. **Heat Transfer**, v.29, 2000.

MATSUMURA Y, MAEDA H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. **Cancer Res.** v.46, p.6387-6392, 1986.

MAY, R. C. *et al.* *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nat. Rev. Microbiol.** v.14, p. 106–117, 2016.

MITCHELL T. G., FRIEDMAN L. In vitro phagocytosis and intracellular fate of variously encapsulated strains of *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.** v.5, p. 491–498, 1972.

MOREIRA T.A.; FERREIRA M.S.; RIBAS R.M.; BORGES A.S. Criptococose: estudo clínico-epidemiológico, laboratorial e das variedades do fungo em 96 pacientes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.3, p.255-258, 2006.

MPOZA E., RHEIN J., ABASSI M., Emerging fluconazole resistance: Implications for the management of cryptococcal meningitis. *Medical Mycology Case Reports*, v. 19, p.30-32, 2018.

MYLONAKIS E., AUSUBEL F.M., PERFECT J.R, HEITMAN J., CALDERWOOD S.B. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 99, p. 15675–15680. 2002.

NEILSON J. B., FROMTLING R. A., BULMER G. S. *Cryptococcus neoformans*: size range of infectious particles from aerosolized soil. **Infect. Immun.** v.17, p. 634–638, 1977.

O'MEARA T.R., ALSPAUGH A. The *Cryptococcus neoformans* Capsule: a Sword and a Shield. **Clin. Microbiol. Rev.** V.25, n.3, p. 387-408, 2012.

PFEIFFER T.J., ELLIS D.H. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus tereticornis*. **J. Med. Vet. Mycol.** v.30, p.407–8, 1992.

PHILLIPS, P. *et al.* Longitudinal clinical findings and outcome among patients with *Cryptococcus gattii* infection in British Columbia. **Clin. Infect. Dis.** V.60, p.1368–1376, 2015.

PYRGOS V. *et al.* Epidemiology of cryptococcal meningitis in the US. **PLoS ONE**, v.8, p. 1997–2009, 2013.

QAYYUM S., OVES M., KHAN A. U. Obliteration of bacterial growth and biofilm through ROS generation by facilely synthesized green silver nanoparticles. **PLoS ONE**. V. 12, n.8, p. 1-18, 2017.

RAJASINGHAM R., ROLFES M. A., TENGSUPAKUL S., MOSSEL E. C., AKAMPURIRA A., BOULWARE D. R., RHEIN J. Epidemiology of meningitis in an HIV-infected Ugandan cohort. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. V. 92, p. 274–279, 2015.

RAMOS A.P., CRUZ M.A.E., TOVANI C.B., CIANCAGLINI P., Biomedical applications of nanotechnology. **Biophysical Reviews**, v.9, n.2, p.79-89, 2017.

REOLON A.; PEREZ L.R.R.; MEZZARI A. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da Cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.40, n.5, p.293-298, 2004.

RIVERA J., FELDMESSER M., CAMMER M., CASADEVALL A. Organ-dependent variation of capsule thickness in *Cryptococcus neoformans* during experimental murine infection. **Infect. Immun.** v. 66, p. 5027–5030, 1998.

RÓNAVÁRI A., IGAZ N., GOPISETTY M.K., SZERENCSEB B., KOVÁCS D., PAPP C., VÁGVOLGYI C., BOROS I.M., KÓNYA Z., KIRICSI M., PFEIFFER I., Biosynthesized silver and gold nanoparticles are potent antimycotics against opportunistic pathogenic yeasts and dermatophytes. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 695-703, 2018.

RÓNAVÁRI A., KOVACS D., IGAZ N., VÁGNOLGYI C., BOROS I.M., KÓNYA Z., PFEIFFER I., KIRICSI M., Biological activity of green-synthesized silver nanoparticles

depends on the applied natural extracts: A comprehensive study. **International Journal of Nanomedicine**, v.12, p.871-883, 2017.

SILVA L.P, BONATTO C.C., PEREIRA F.D.E.S., SILVA L.D., ALBERNAZ V.L., POLEZ V.L.P., Nanotecnologia verde para síntese de nanopartículas metálicas, **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**, V. 4, p. 967 -1012, 2017.

SILVER S. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. **FEMS. Microbiol. Rev**, v. 27, p. 341–353, 2003.

SOARES E., LAZERA M., WANKE B., FERREIRA M., DE OLIVEIRA R.,V., OLIVEIRA A. G., COUTINHO Z.F., Mortality by cryptococcosis in Brazil from 2000 to 2012 A descriptive epidemiological study, **PLoS Neglected Tropical Diseases**, V.13, n.7, p.1-17, 2019.

TAKEMURA, H., OHNO, H., MIURA, I., TAKAGI, T., OHYANAGI, T., KUNISHIMA, H., NAKASHIMA, H. The first reported case of central venous catheter-related fungemia caused by *Cryptococcus liquefaciens*. J. Infect. complex in a human immunodeficiency virus-infected patient. **Journal of Infection and Chemotherapy**. V. 53, p. 2753–2755, 2015.

TAYLOR E FRANCIS. Handbook on Nanoscience, Engineering and Technology, 2nd Ed., 2007.

THAKKAR K.N., MHATRE S.S., PARIKH R.Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. V. 6, p. 257–262, 2010.

TUCKER S. C., CASADEVALL A. Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v.99, p. 3165–3170, 2002.

VASIR J.K, LABHASETWAR V. Targeted drug delivery in cancer therapy, **Technol Cancer Res Treat**. V.4, n.4, p. 363-74, 2005.

VAZQUEZ-MUNOZ R., AVALOS-BORJA M., CASTRO LONGORIA E. Ultrastructural Analysis of *Candida albicans* When Exposed to Silver Nanoparticles. **PLoS ONE**. V. 9, p. 1-10, 2014.

VITALE R.G., PASCUCCELLI V., AFELTRA J. Influence of capsule size on the in vitro activity of antifungal agents against clinical *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* strains. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, p. 384–388, 2012.

VITHIYA K., SEN S. Biosynthesis of nanoparticles. **IJPSR**, v. 2, n.11, p.2781-2785, 2011.

WANG H., XU K., LIU L., TAN J.P.K., CHEN Y., LI Y., FAN W., WEI Z., SHENG J., YANG Y.Y, LI L. The efficacy of self-assembled cationic antimicrobial peptide nanoparticles against *Cryptococcus neoformans* for the treatment of meningitis. **Biomaterials** v. 31; p. 2874–288, 2009.

WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* Melanin and Virulence: Mechanism of Action. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 8, p. 3131-3136, 1995.

ZARAGOZA O., FRIES B.C., CASADEVALL A. Induction of Capsule Growth in *Cryptococcus neoformans* by Mammalian Serum and CO₂. **Infection and Immunity**, v.71, n. 11, 6155-6164, 2003.

ZARAGOZA O., TABORDA C. P., CASADEVALL A. The efficacy of complement-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* is dependent on the location of C3 in the polysaccharide capsule and involves both direct and indirect C3-mediated interactions. **Eur. J. Immunol.** v. 33, p. 1957– 1967, 2003

ZARAGOZA, O. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. **Virulence**, v.10, n.1, p. 490-501, 2019.

ZHANG J.Z., NOGUEZEL C. Plasmonic Optical Properties and Applications of Metal Nanostructures. **Plasmonics**. v. 3, p. 127–150, 2008.

ZHANG C., CHEN M., WANG G., FRANG W., YE C., HU H., FA Z., YI J., LIAO W.Q., Pd@Ag nanosheets in combination with amphotericin B exert a potent anti-cryptococcal fungicidal effect. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1-18, 2016.

ZHAO G.J., STEVENS S.E. Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of Escherichia coli to the silver ion. **Biometals**, v. 11, p.27–32, 1998.

Zhu, L.-P., Wu, J.-Q., Xu, B., Ou, X.-T., Zhang, Q.-Q., & Weng, X.-H. Cryptococcal meningitis in non-HIVinfected patients in a Chinese tertiary care hospital, 1997–2007. **Medical Mycology**. v.48, p. 570–579, 2010.

LIN X., HEITMAN J., The Biology of the Cryptococcus neoformans Species Complex. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, n.1, p. 69-105, 2006.