



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Adriele Dandara Levorato Vinche

“Atividade da liriodenina extraída de *Annona macrophyllata* sobre isolados do gênero *Paracoccidioides*.”

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Doenças Tropicais.

Orientador : Prof. Titular Rinaldo Poncio Mendes

**Botucatu
2018**

Adriele Dandara Levorato Vinche

“Atividade da liriodenina extraída de *Annona macrophyllata* sobre isolados do gênero *Paracoccidioides*.”

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Titular Rinaldo Poncio Mendes

Botucatu
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Vinche, Adriele Dandara Levorato.

Atividade da liriodenina extraída de *Annona macrophyllata* sobre isolados do gênero *Paracoccidioides* / Adriele Dandara Levorato Vinche. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Rinaldo Poncio Mendes

Capes: 40101096

1. Annonaceae. 2. Paracoccidioidomicose. 3. Micoses sistêmicas. 4. Camundongo como animal de laboratório.

Palavras-chave: Camundongos; Compostos antifúngicos; Liriodenina; Micoses sistêmicas; Paracoccidioidomicose.

Dedicatória

*Aos meus pais **Dirço e Luzia**, que não mediram esforços para a minha formação profissional, pelos abraços e incentivo em continuar a caminhada. Obrigada por tudo. Amo vocês.*

*À minha irmã **Cleice**, pelo incentivo, apoio e palavras de conforto durante os momentos difíceis durante esta caminhada. Amor por toda a vida.*

*Ao meu esposo e grande amigo **Diego**, por sempre me apoiar nas decisões a serem tomadas, por sempre dizer “Calma, vai dar tudo certo” e que apesar da minha ausência sempre esteve presente. Te amo.*

*Ao meu orientador, **Dr. Rinaldo “Tiete” Poncio Mendes**, não apenas pela orientação deste trabalho, mas pelos conselhos, paciência, ensinamentos e por acreditar na minha capacidade profissional. Muito obrigada pelo incentivo durante 7 anos.*

Agradecimientos

A Deus, por guiar os meus passos, por mostrar os caminhos que devem ser seguidos e pelo conforto durante os momentos que mais precisei.

Á Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

A toda equipe de trabalho, Dr. Ricardo de Souza Cavalcante, Dra. Daniela Vanessa Moris, Tatiane Fernanda Sylvestre, Lariza Maza, Beatriz Aparecida Soares Pereira, Camila Marçon, Julhiany de Fátima Silva.

Aos colaboradores desse trabalho, Lariza Maza, Camila Marçon, Beatriz Aparecida Soares Pereira, Dr. Iván de La Cruz Chácon, Dra. Gisela Ferreira, Dra. Carmen Silvia Fernandes Boaro, Dra. Daniela Vanessa Moris, Dr. Ricardo de Souza Cavalcante, Dra. Daniela Carvalho dos Santos, Dr. Alexandre Todorovic Fabro, pela ajuda, paciência e apoio.

Aos amigos e pós-graduandos do Laboratório de Moléstias Infecciosas Sueli Aparecida Calvi, Tatiane Fernanda Sylvestre, James Venturini, Mariana Gatto, Vanessa Martinez Manfio, Thaysa Carvalho, Luiz Roberto de Oliveira Junior, Mateus Fiorini, Carolina Nogueira Gomes Bassetto, Nayore Tamie Takamiya, Thalita Cortez Martins, Guilherme Marques, Karina Tomazini e Karen Ingrid Tasca pela convivência, reclamações e risos. Admiro cada um a seu modo.

*Às amigas e companheiras de república **Mariana Gatto e Tatiane Fernanda Sylvestre**, por todo apoio concedido nos momentos de alegrias e tristezas, risos e pelo companheirismo durante todos esses anos.*

*À minha amiga, companheira e comadre **Tatiane Fernanda Sylvestre**, pelo convívio diário desde o tempo da graduação em Araraquara, pela moradia nos dias que precisei, pelas risadas, choros e momentos de ansiedade. Muito obrigada!*

*Às meninas da república **Thalita Cortez Martins, Rosana Minatel e Amanda Carreira Devides** pelo ótimo acolhimento na república nos dias que precisei.*

*Aos funcionários da Pós-Graduação e do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, em especial **Bruna Quirino Jorgetto**, pelo auxílio e atenção em todos os momentos.*

*À **coordenadoria** e ao programa de **Pós-Graduação em Doenças Tropicais**, pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos e confiança em meu trabalho.*

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste doutorado.

*Ao responsável pelo Laboratório de Moléstias Infeciosas **Sueli Aparecida Calvi Rodrigo Mattos dos Santos**, pelo auxílio nos momentos que precisei.*

Epígrafe

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingido o alvo, quem busca e quem vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.” (José de Alencar)

Resumo

A paracoccidioidomicose (PCM) é micose granulomatosa sistêmica causada por fungos termodimórficos do gênero *Paracoccidioides*. O presente estudo teve como objetivos avaliar a atividade da liriodenina, extraída de *Annona macrophyllata* Donn. Sm, sobre isolados clínicos e cepas padrão de fungos do gênero *Paracoccidioides* e outras espécies que causam micoses sistêmicas e, através de um estudo-piloto realizado em modelo murino, avaliar a absorção da liriodenina e possíveis efeitos indesejáveis. A concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) da liriodenina foram determinadas pelo método de microdiluição. As alterações celulares causadas pela liriodenina em *P. brasiliensis* / cepa padrão Pb18 foram avaliadas pela microscopia eletrônica de transmissão (MET) e de varredura (MEV). Em estudo-piloto, quatro camundongos isogênicos albinos, da linhagem BALB/c, foram utilizados para avaliar a absorção e os efeitos indesejáveis da liriodenina. Os animais, sem infecção, foram divididos em dois grupos: grupo 1, com dois camundongos que receberam a dose de 0,75 mg.kg⁻¹ e grupo 2, com dois camundongos que receberam a dose de 1,50 mg.kg⁻¹, em única tomada. Após seis e 12 horas após a administração, os animais foram sacrificados e amostras de sangue foram coletadas para a determinação dos níveis séricos. Os intestinos foram coletados para exame histológico. O teste de sensibilidade *in vitro* revelou que a liriodenina possui atividade sobre parte dos fungos do gênero *Paracoccidioides*, com valores de CIM entre 31,2 e 250 µg.mL⁻¹ e sobre a cepa padrão de *Histoplasma capsulatum* (CIM de 1,95 µg.mL⁻¹). No entanto, menor atividade foi observada em leveduras da maioria das espécies de *Candida* ensaiadas, com CIM de 125 a 250 µg.mL⁻¹, e maior atividade sobre as cepas padrões de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (CIM de 62,5 µg.mL⁻¹), enquanto a cepa de *Aspergillus fumigatus* revelou-se resistente à maior concentração de liriodenina. Deve-se ressaltar a atividade da liriodenina sobre *Candida krusei*, que é intrinsecamente resistente ao fluconazol e, ao

contrário, a ausência de atividade sobre *Candida tropicalis*. A liriodenina revelou ter atividade fungicida sobre todas as cepas padrão e isolados clínicos que foram inibidos *in vitro*. A MET revelou alterações citoplasmáticas e danos na parede celular de *P.brasiliensis*. O estudo-piloto revelou que, após 12 horas da administração da liriodenina, os animais que receberam a dose de 1,50 mg.kg⁻¹ apresentavam gases intestinais e distensão abdominal, achados não observados nos que receberam 0,75 mg.kg⁻¹. Os exames histológicos não evidenciaram alterações de intestino com nenhuma das doses empregadas. Níveis séricos de liriodenina foram detectados em ambos os grupos de animais. No entanto, os animais que receberam 0,75 mg.kg⁻¹ de liriodenina apresentaram aumento da concentração com o passar do tempo, enquanto achado oposto foi observado nos que receberam 1,50 mg.kg⁻¹. Os testes de sensibilidade *in vitro* indicaram que a liriodenina é uma alternativa promissora no tratamento de várias micoses sistêmicas. O estudo-piloto revelou que a liriodenina é absorvida após administração por gavagem, embora a dose de 1,50 mg.kg⁻¹ tenha induzido alterações funcionais, caracterizadas por formação exagerada de gases e conseqüente distensão abdominal, que talvez possam explicar a diminuição de sua absorção. Os resultados do presente estudo estimulam a realização da avaliação da farmacocinética da liriodenina, de sua ação antifúngica em maior número de isolados de espécies de *Candida* spp, *Cryptococcus* spp, *Histoplasma capsulatum* e fungos do gênero *Paracoccidioides* e de sua eficácia em infecções experimentais em modelo murino. Por se tratar de composto antifúngico não pertencente às classes hoje utilizadas na terapia antifúngica, pode vir a contribuir com o tratamento de pacientes com infecções fúngicas resistentes.

Palavras-chave: liriodenina, paracoccidioidomicose, micoses sistêmicas, compostos antifúngicos, absorção, camundongos, gavagem e efeitos colaterais.

Summary

Paracoccidioidomycosis (PCM) is systemic granulomatous mycosis caused by thermodynamically fungi of the genus *Paracoccidioides*. The present study aimed to evaluate the activity of liriodenine, extracted from *Annona macrophyllata* Donn. Sm on clinical isolates and standard strains of fungi of the genus *Paracoccidioides* and other species that cause systemic mycoses and, through a pilot study conducted in a murine model, to assess the absorption of liriodenine and possible undesirable effects. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (CFM) of liriodenine were determined by the microdilution method. Cellular alterations caused by liriodenine in *P. brasiliensis* / Pb18 standard strain were evaluated by transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM). In a pilot study, four albino isogenic mice of the BALB / c strain were used to assess the absorption and undesirable effects of liriodenine. The animals, without infection, were divided into two groups: group 1, with two mice receiving the dose of 0.75 mg.kg^{-1} and group 2, with two mice receiving the dose of 1.50 mg.kg^{-1} , in single outlet. After six and 12 hours after administration, the animals were sacrificed and blood samples were collected for the determination of serum levels. The intestines were collected for histological examination. The *in vitro* sensitivity test revealed that liriodenine has activity on part of fungi of the genus *Paracoccidioides*, with MIC values between 31.2 and $250 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ and on the standard *Histoplasma capsulatum* strain (MIC of $1.95 \text{ } \mu\text{g .mL}^{-1}$). However, lower activity was observed in yeasts of most *Candida* species tested, with MIC of 125 to $250 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$, and greater activity on the standard strains of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* (MIC of $62.5 \text{ } \mu\text{g. mL}^{-1}$), while the strain of *Aspergillus fumigatus* was resistant to the highest concentration of liriodenine. The activity of liriodenine on *Candida krusei*, which is intrinsically resistant to fluconazole and, on the contrary, the absence of activity on *Candida tropicalis* should be emphasized. Liriodenine revealed fungicidal activity

over all standard strains and clinical isolates that were inhibited *in vitro*. MET showed cytoplasmic alterations and damage to *P. brasiliensis* cell wall. The pilot study revealed that animals receiving the 1.50 mg.kg⁻¹ dose had no intestinal gas and abdominal distension 12 hours after administration of liriodenine, which were not observed in those receiving 0.75 mg.kg⁻¹. Histological examinations showed no intestinal changes at any of the doses used. Serum levels of liriodenine were detected in both groups of animals. However, animals receiving 0.75 mg.kg⁻¹ liriodenine showed increased concentration over time, while the opposite finding was observed in those receiving 1.50 mg.kg⁻¹. *In vitro* sensitivity tests indicated that liriodenine is a promising alternative in the treatment of various systemic mycoses. The pilot study revealed that liriodenine is absorbed after administration by gavage, although the 1.50 mg.kg⁻¹ dose induced functional alterations, characterized by exaggerated gas formation and consequent abdominal distension, which may explain the decrease of its absorption. The results of the present study stimulate the evaluation of the pharmacokinetics of liriodenine, its antifungal action in a greater number of isolates of *Candida* species, *Cryptococcus* spp, *Histoplasma capsulatum* and fungi of the genus *Paracoccidioides* and their efficacy in experimental infections in murine model. Because it is an antifungal compound that does not belong to the classes currently used in antifungal therapy, it may contribute to the treatment of patients with resistant fungal infections.

Key words: liriodenine, paracoccidioidomycosis, systemic mycoses, antifungal compounds, absorption, mice, gavage and side effects.

Sumário

I) Capítulo I - Introdução.....	1
1. Aspectos gerais da paracoccidioidomicose e dos fungos do gênero <i>Paracoccidioides</i>	1
1.1. Tratamento da paracoccidioidomicose.....	6
2. Ação antimicrobiana de extratos vegetais.....	7
3.Objetivos.....	12
3.1. Objetivo geral.....	12
3.2. Objetivos específicos.....	12
4. Referências bibliográficas.....	13
II) Capítulo II.....	21
Artigo I. Atividade da liriodenina sobre fungos do gênero <i>Paracoccidioides</i> e outros fungos fungos causadores de micoses sistêmicas.....	21
Introdução.....	22
Material e Métodos.....	23
Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.....	28
Resultados.....	29
Discussão.....	35
Referências bibliográficas.....	41
Artigo II. Avaliação da absorção da liriodenina administrada por gavagem a camundongos da linhagem BALB/c. Estudo-piloto.....	49
Introdução.....	49
Material e Métodos.....	51
Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal.....	54
Resultados.....	54

Discussão.....	58
Referências bibliográficas.....	59
III) Conclusões.....	61
IV) Anexos.....	63

Capítulo I – Introdução

I. Introdução

1. Aspectos gerais da paracoccidiodomicose e dos fungos do gênero *Paracoccidioides*

A paracoccidiodomicose (PCM) é micose sistêmica causada por fungos termodimórficos que se classificam em duas espécies: *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*¹. Confinada à América Latina, é endêmica em área que se estende do México à Argentina². Apesar de incompletos, os dados disponíveis indicam maior incidência dessa micose no Brasil, onde é diagnosticada com grande frequência no Estado de São Paulo.

3

Foi descrita pela primeira vez por Adolpho Lutz⁴ em 1908 que, em lesões bucais de dois pacientes de São Paulo, encontrou fungos esféricos, com morfologia diferente da revelada pelo *Coccidioides immitis*. As principais manifestações clínicas dos pacientes incluíam amolecimento dos dentes e comprometimento de mucosa oral, laringe, linfonodos, glândula salivar e traqueia. Lutz registrou que o exame histopatológico desses pacientes revelava reação tuberculóide com fungos, células gigantes, células epitelióides e fungos com exo-esporulação. Esse pesquisador também isolou o fungo em cultivo, demonstrou a existência das fases micelial em cultivo à temperatura ambiente e leveduriforme em pacientes infectados, e reproduziu a doença em cobaias. Deve-se registrar que poucos pesquisadores foram tão completos ao descreverem uma nova doença e seu agente etiológico.

Essa micose foi inicialmente denominada Blastomicose Sul-Americana (BSA) ou Doença de Lutz, Splendore e Almeida⁵. No entanto, a oficialização do termo paracoccidiodomicose se deu no *First Pan American Symposium on Paracoccidioidomycosis*, realizado em Medellín, Colômbia, única denominação utilizada por Ayello em sua conferência de abertura, na qual abordou aspectos históricos dessa micose sistêmica⁶. Essa denominação se justifica, pois casos autóctones de PCM já tinham sido

descritos na América Central e no México, motivo pelo qual deixava de ser unicamente sul-americana. Além disso, já se iniciava uma nova abordagem na sistemática de fungos, ligando-se o nome da doença ao de seu agente etiológico.

Uma das principais características desse fungo imperfeito é o dimorfismo térmico. Em tecidos humanos e em culturas mantidas a 37°C apresenta-se na fase leveduriforme, sua forma patogênica, com parede rica em α -glucana. Em temperatura ambiente apresenta-se na fase filamentosa, sua forma infectante que ocorre em natureza, com parede rica em β -glucana.²

Apesar de existirem áreas endêmicas bem definidas para este patógeno, o nicho ecológico de sua fase sapróbia continua mal caracterizado, devido ao pequeno número de vezes em que o fungo foi isolado do ambiente^{7,8}, ao longo período de latência da doença⁹ e ao pequeno número de relatos da doença em animais domésticos¹⁰ ou selvagens^{11,12}. Em 1986, Naiff et al.¹³ relataram o isolamento de *P. brasiliensis* em tatus da espécie *Dasypus novemcinctus*, estudados em Tucuruí - Pará, área até então considerada não-endêmica para esta doença.

Admite-se que a infecção seja adquirida quando propágulos da fase micelial do fungo são inalados, instalando-se nos alvéolos pulmonares. A seguir, o fungo passa à fase leveduriforme, transformação considerada fundamental para que se estabeleça a infecção^{14,15}. O fungo pode, então, se disseminar por via hematogênica e, ou, linfática para qualquer parte do organismo¹⁴. A penetração cutânea direta do fungo é muito rara, apesar de ter sido documentada em alguns casos, em acidentes com espinhos e em laboratório.¹⁶

A quase totalidade dos estudos sobre infecção paracoccidióidica e paracoccidioidomicose foi realizado com *P. brasiliensis*, pois é recente a identificação da espécie *P. lutzii*.^{17,18}

Ao entrar no organismo, *P. brasiliensis* pode ser destruído imediatamente ou

multiplicar-se, produzindo uma lesão de inoculação e se disseminando para linfonodos regionais. Desta forma, constitui-se o complexo primário, formado pelo polo parenquimatoso, pela linfangite ascendente e pelo pólo ganglionar satélite. A infecção paracoccidióidica pode regredir ou progredir, dependendo de fatores ligados ao fungo e ao hospedeiro. A regressão pode ser acompanhada de destruição de todos os fungos, formando-se cicatriz local estéril ou se acompanhar da persistência de focos quiescentes, com fungos viáveis. A progressão da infecção determina o aparecimento de sinais e sintomas, o que caracteriza a doença ativa ¹⁹. Os focos latentes podem apresentar reativação posterior, denominada reinfecção endógena, e levar à doença ativa.

As manifestações clínicas da PCM se relacionam, em geral, ao comprometimento de pulmões, pele, mucosa das vias aerodigestivas superiores, adrenais e de órgãos ricos no sistema fagocítico mononuclear, tais como fígado, baço, linfonodos e medula óssea ¹⁴. No entanto, deve-se registrar que a PCM pode comprometer qualquer órgão, aparelho ou sistema.

A PCM se apresenta sob três formas clínicas principais: forma aguda / subaguda e forma crônica, que são manifestações de doença ativa e forma residual, que se apresenta como sequelas. A forma aguda / subaguda, também chamada forma juvenil, é responsável por 20 a 25% dos casos, acomete em geral crianças, adolescentes e adultos jovens, caracteriza-se por apresentar instalação mais rápida, de algumas semanas a poucos meses e apresentar envolvimento predominante do sistema reticuloendotelial, isto é, baço, fígado, nódulos linfáticos e medula óssea. Nessa forma clínica as manifestações pulmonares são raras e a presença de lesões de mucosa das vias aerodigestivas superiores é pouco frequente. Nos tecidos são encontrados muitos fungos em multiplicação e granulomas, em geral, frouxos. A forma crônica, também denominada do adulto, ocorre em 75% a 80% dos casos, em geral acomete indivíduos com idade superior a 30 anos e que apresentam história clínica de longa

duração, com frequência acima de quatro meses e muitas vezes superior a seis meses. As manifestações pulmonares são muito frequentes e em geral associadas ao comprometimento de outros órgãos, tais como mucosa das vias aerodigestivas superiores, pele e, por vezes, adrenais. As formas residuais, também denominadas sequelas, são observadas após tratamento e se caracterizam pelas manifestações clínicas ligadas às lesões cicatriciais observadas após tratamento, entre as quais se destacam fibrose e enfisema pulmonar e doença de Addison.^{20,21}

Como não é doença de notificação compulsória no Brasil, a real prevalência da PCM não pode ser calculada. Assim, deve-se a Coutinho et al.²² o estudo de 3181 óbitos por PCM no Brasil, entre 1980 e 1995, que demonstraram a grande magnitude e a baixa visibilidade dessa micose, destacando que constituía a oitava causa de mortalidade por doença predominantemente crônica ou repetitiva, entre as infecciosas e parasitárias, e a mais elevada taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas. Os autores também relataram que a taxa média de mortalidade anual era de 1,45 para um milhão de habitantes. No Estado de São Paulo, a notificação compulsória da PCM foi sugerida em 2008, após criterioso estudo realizado por um grupo de especialistas designado pela Secretaria de Estado da Saúde (São Paulo), que produziu inclusive o Manual de Vigilância e Controle da Paracoccidioidomicose. No entanto, esse trabalho nunca foi institucionalizado. O Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina de Botucatu recebe em média 15 casos novos por ano, e mantém cuidadoso seguimento de seus pacientes.²³

A infecção é muito mais frequente que a doença, pois muitos indivíduos se infectam com o fungo, mantêm focos latentes por toda a vida e nunca adoecem. Inquérito realizado em 2004 na cidade de Pratânia (SP), por meio de reações intradérmicas com paracoccidioidina e histoplasmina em 338 indivíduos, revelou que 51,2% da população eram, ao mesmo tempo, paracoccidioidino-positivos e histoplasmino-negativos, o que demonstra elevada prevalência

de infecção paracoccidióidica, pois os outros fungos que poderiam propiciar reação cruzada com antígenos de *P. brasiliensis* não têm sido identificados na região. Esse mesmo estudo revelou que, entre crianças de 5 a 13 anos de idade, essa prevalência era igual a 32,5%, o que demonstra contato precoce com o fungo.²⁴

A PCM é observada em pacientes que tiveram ou se encontram em contato direto e prolongado com o solo, como os trabalhadores rurais^{3,14,25,26}. Predomina em indivíduos do sexo masculino, com razão de masculinidade de 1,7:1,0 na forma aguda/subaguda e de 22,0:1,0 na forma crônica e é mais prevalente na faixa etária entre 30 e 59^{3,25,65,27}. O estrogênio pode explicar a menor prevalência de PCM em pacientes do sexo feminino, pois retarda ou impede as transições micélio-levedura e conídio-levedura, necessárias para que o fungo atinja a fase patogênica, o que pode explicar o reduzido número de mulheres afetadas pela doença na idade adulta e a observação da mesma prevalência em ambos os sexos em pacientes com idade inferior a 13 anos.^{28,29,30}

Os doentes com PCM revelam comprometimento imune celular específico, isto é, resposta deficiente a antígenos de *P. brasiliensis*, mas não aos de outros agentes infecciosos³⁰. Falhas na apresentação do antígeno, inalação de grande inóculo fúngico, excesso de imunocomplexos circulantes e deficiência de receptores para interleucina-2 (IL-2) parecem estar ligados a uma resposta insatisfatória das células T. O comprometimento da resposta das células T se acompanha de diminuição da atividade fungicida dos macrófagos. Portanto, os pacientes apresentam comprometimento do perfil Th1 da resposta imune celular, com baixos níveis de TNF- α , IFN- γ e IL-2, associado à manutenção ou à elevação da produção de IL-5, IL-10 e TGF- β , que caracteriza a exacerbação do perfil Th2³⁰. Estudos recentes têm revelado a existência de fatores genéticos que comprometem a resposta imune, tais como deficiência de CD40 ligante, anormalidades das células dendríticas e defeito no eixo IL-12-IFN- α devido à

mutação no STAT4, heterozigoto. ^{31,32,33,34}

A produção de anticorpos específicos se encontra aumentada em pacientes com as formas aguda e crônica da PCM ³⁵. No entanto, além de facilitar a opsonização de células fúngicas, não se conhece outra ação dos anticorpos na defesa do hospedeiro. Além disso, deve-se registrar que a gravidade da doença guarda relação inversa com a resposta imune celular e direta com os níveis séricos de anticorpos específicos. ^{35,36}

1.1. Tratamento da paracoccidioidomicose

O tratamento da PCM consiste de duas fases: inicial ou de ataque e de consolidação. O tratamento de ataque deve ser mantido até que se observem cura clínica e normalização da velocidade de hemossedimentação e o de consolidação até um ano após as curas micológica, radiológica e sorológica. Os fármacos eficazes contra a PCM compreendem três grupos: anfotericina B - AmB, do grupo dos antibióticos poliênicos; sulfadiazina e associação sulfametoxazol-trimetoprim; e azólicos, entre os quais se destacam o cetoconazol, derivado imidazólico e o itraconazol, derivado triazólico de primeira geração. ³⁷

Atualmente, itraconazol (ITC) e a associação sulfametoxazol-trimetoprim também denominada cotrimoxazol (CMX) são os principais fármacos utilizados no tratamento da PCM. Queixas de intolerância gástrica com o uso de CMX são relatadas em alguns casos, mas raramente é necessária a substituição da medicação. Estudo realizado em 200 pacientes com PCM revelou que o uso de ITC aumenta a chance de hepatotoxicidade quando comparado com CMX, com persistente elevação dos níveis séricos de bilirrubina direta, bilirrubina total e fosfatase alcalina ³⁸. O CMX apresenta vantagem de ser distribuído gratuitamente pelos serviços ligados ao Ministério da Saúde e Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, para tratamento de doenças bacterianas e da PCM.

O ITC, na maioria dos casos relatados na literatura, é uma excelente opção no

tratamento da PCM, devido à sua eficácia e tolerabilidade. Derivado triazólico de primeira geração com afinidade seletiva pelo citocromo P-450 da célula fúngica, esta característica permite que pequenas concentrações do itraconazol inibam a biossíntese do ergosterol, sem interferir nas substâncias dependentes do citocromo P-450 humano, como o colesterol. A dose utilizada no tratamento é de 200 mg/dia, com duração de tratamento que varia de 9 a 18 meses. O uso de ITC apresenta benefícios como eficácia, duração do tratamento e aderência quando comparado ao cotrimoxazol.^{39,40}

2. Ação antimicrobiana de extratos vegetais

O uso de plantas para fins terapêuticos e profiláticos é uma das práticas mais antigas da humanidade. Além disso, a emergência de resistência de microrganismos tem contribuído para o aumento da busca de extratos vegetais com propriedades antimicrobianas.

A família *Annonaceae* pertence à ordem *Magnoliales*, subclasse *Magnoliidae*. É constituída por aproximadamente 108 gêneros e mais de 2000 espécies distribuídas amplamente nas regiões tropicais e subtropicais.^{41,42}

As espécies que compreendem a família são árvores ou arbustos, com folhas e flores simples e frutos que variam de tamanho e formas. As árvores frutíferas incluem fruto do conde ou pinha (*A. squamosa* L), cherimoia (*A. cherimola* Mill), graviola (*A. muricata* L) e a atemoia (*A. cherimola* Mill x *A. squamosa* L).⁴³

No Brasil, foram registrados 29 gêneros que compreende 390 espécies⁴⁴. As principais espécies encontradas são: *Annona squamosa*, *Annona muricata* e *Annona cherimola*. A produção se encontra em desenvolvimento principalmente nos estados de Alagoas (AL), Bahia (BA), Ceará (CE), Pernambuco (PE), Paraná (PR), Minas Gerais (MG) e São Paulo (SP).⁴⁵

No México, um levantamento bibliográfico sobre os gêneros e espécies encontrados

no país, demonstrou que 14 gêneros e 62 espécies de *Annonas* são registradas na Rede Mundial de Informação sobre Biodiversidade (REMIB). Os gêneros encontrados são: *Anaxagorea*, *Annona*, *Desmopsis*, *Cymbopetalum*, *Guamia*, *Guatteria*, *Malmea*, *Oxandra*, *Tridimeris*, *Rollinia*, *Sapranthus*, *Xylopia*, *Mosannonna* e *Stenannonna*.⁴⁶

A família *Annonaceae* apresenta ampla diversidade de espécies e produção de metabólitos secundários com atividade terapêutica. Desse modo, destacam-se os flavonoides, que possuem propriedades antimicrobiana e antitumoral; diterpenos, com atividade antitumoral, antibacteriana e antifúngica; acetogeninas, com características antitumorais, antibacterianas, antifúngicas, antiparasitárias e inseticida, e os alcalóides benzilisoquinolínicos, com funções antibacteriana, antiparasitária, antitumoral e inseticida.^{47,48}

Entre os alcalóides isoquinólicos, destaca-se a liriodenina, um alcaloide do tipo oxoaporfínico (**Figura 1**) com atividade antibacteriana, antifúngica, antiprotozoária e citotóxica. Este componente é amplamente distribuído e atua como marcador quimiotaxônomico na família *Annonacea*.⁴⁹⁻⁵²

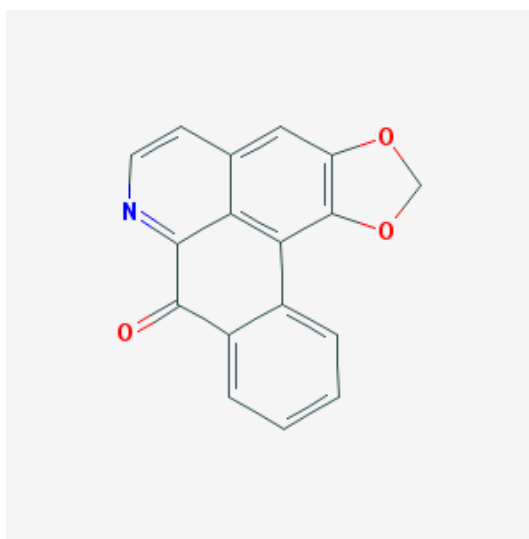


Figura 1. Estrutura química da liriodenina

Uma ampla revisão da literatura foi realizada utilizando-se pesquisa eletrônica e manual. O levantamento bibliográfico foi realizado nos bancos de dados PUBMED, que

engloba o MEDLINE, *Science Direct*, Periódicos Capes e Scielo. Os termos utilizados foram atividade antibacteriana, atividade antifúngica, extrato, plantas e *Annonaceae* no período de 1990 a 2017.

A busca eletrônica e manual em base de dados resultou na identificação de 7866 estudos que avaliaram a ação antibacteriana e antifúngica de extratos vegetais. Em relação a estudos com a família *Annonaceae* a busca resultou em apenas 29 artigos que abordaram sua ação antifúngica.

Dos 29 artigos identificados, três abordaram a ação de extratos de *Annona* sobre fungos causadores de micoses superficiais e 29 em micoses sistêmicas, como paracoccidioidomicose, candidíase, criptococose e aspergiloses. Em relação às micoses sistêmicas, 20 artigos abordaram o efeito de seus extratos vegetais sobre leveduras, sete em fungos filamentosos e dois em fungos dimórficos.

Fungos leveduriformes. Estudo com componentes do óleo de *Porcelia macrocarpa*, pelo método de microdiluição, demonstrou inibição de 85% no crescimento de *Cryptococcus neoformans* sorotipo D na concentração de 0,06 mg.mL⁻¹. Por outro lado, os isolados de *Cryptococcus gatti* apresentaram uma inibição somente com a concentração de 1,0 mg.mL⁻¹ do componente .⁵³

A ação do extrato metanólico de *Cleistopholis patens* foi avaliada em isolados de várias espécies de *Candida* – *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. Kefyr*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Esse extrato apresentou ação sobre as cepas de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*.^{54,55}

O gênero *Duguetia* também possui compostos com ação antifúngica. Estudo desenvolvido por Pinho et al.⁵⁶ revelou que o extrato metanólico e o acetato de etila possuem ação sobre cepas de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, em concentração inibitória mínima

maior ou igual a 1024 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Estudo realizado por da Silva et al.⁵⁷, revelou que o óleo essencial de *Duguetia gardneriana* e *Duguetia moricandiana* possui ação contra cepas de *C. guilliermondii* e *C. albicans*, respectivamente.

Fungos filamentosos. O extrato clorofórmico de *Annona glabra* revelou ação antifúngica sobre cepas de *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporium gypseum* e *Epidermophyton floccosum*.⁵⁸

A ação do extrato metanólico de *Annona reticulata* foi avaliada sobre *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium moneliforme*, *Aspergillus flavus*, *Trichoderma viride* e *Candida albicans*, observando-se apenas redução no crescimento de *T. viride* e *C. albicans*.⁵⁹

Os fitoconstituintes anonaina, reticulina, laureliptina e isoboldina de *Annona salzmanii* demonstram potencial atividade antifúngica contra isolados de *Trichophyton rubrum* e *Microsporium canis*.⁶⁰

Diferentes extratos de *Annona squamosa* revelaram potencial atividade antifúngica sobre fungos filamentosos. Os extratos clorofórmico, metanólico e aquoso mostraram-se eficazes na inibição do crescimento de cepas de *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Microsporium canis* e *Aspergillus niger*.⁶¹

Fungos dimórficos. Foram encontrados apenas dois estudos realizados *in vitro*, que avaliaram a ação de extratos vegetais derivados de *Annona* sobre fungos do gênero *Paracoccidioides*. Os estudos demonstraram que sementes de *Annona cornifolia* são produtoras de extratos com ação antifúngica, tais como ésteres metílicos de ácidos graxos, 9-hidroxi-folianina, octacetato de sucrose e acetogeninas contra isolados de fungos do gênero *Paracoccidioides*.

Lima et al.⁶² avaliaram, pelo teste de microdiluição em caldo, a ação de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) sobre 12 isolados clínicos de *P. brasiliensis*, observando

inibição de todos eles, com valores da CIM entre 3,4 a 55,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A cepa Pb01 mostrou maior resistência (55,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) em relação aos outros isolados avaliados. Todos os isolados revelaram-se mais susceptíveis ao FAME do que ao sulfametoxazol-trimetoprim.

As acetogeninas de *Annona* também apresentam ação antifúngica sobre isolados do gênero *Paracoccidioides*. Lima et al.,⁶³ avaliaram pelo método de microdiluição em caldo a ação de acetogeninas de *Annona cornifolia* sobre as cepas Pb01 e Pb18. As concentrações de acetogeninas variaram de 1,17 a 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os fármacos padrões cotrimoxazol (CMX) e anfotericina B (AmB) foram utilizados como controle antifúngico. As acetogeninas demonstraram atividade antifúngica sobre as duas cepas padrões de *P.brasiliensis* na concentração igual, ou menor, que 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo mais ativas do que o CMX, no entanto, menos ativas que AmB.

As espécies da família *Annonaceae* estão sendo amplamente estudadas como fontes de antimicrobianos, devido ao grande número de constituintes ativos delas extraídos. Os estudos se baseiam no uso de extratos de diferentes partes das plantas - frutos, cascas, folhas, sementes e raízes. No entanto, além da atividade *in vitro* de determinada substância, sua utilização depende de outras características, tais como farmacocinética, farmacodinâmica, toxicidade em células de mamíferos, que devem ser analisados em modelos experimentais *in vivo*, para posterior aplicação terapêutica.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo geral avaliar a atividade antifúngica, absorção digestiva e efeitos indesejáveis da liriodenina extraída de *Annona macroprophyllata* Donn. Sm.

3.2. Objetivos específicos

1. Avaliar a atividade de diferentes concentrações de liriodenina, pelo teste de sensibilidade *in vitro*, sobre cepas padrão e isolados clínicos de fungos do gênero *Paracoccidioides*.
2. Avaliar a atividade de diferentes concentrações de liriodenina, pelo teste de sensibilidade *in vitro*, sobre cepas padrão de outros fungos causadores de micoses sistêmicas – *Histoplasma capsulatum*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*.
3. Analisar possíveis alterações ultraestruturais na fase leveduriforme de fungos do gênero *Paracoccidioides*, induzidas pela liriodenina em sua concentração inibitória mínima.
4. Avaliar em modelo murino os níveis séricos de liriodenina após administração das doses de 0,75 mg.kg⁻¹ e 1,50 mg.kg⁻¹, por gavagem.
5. Analisar possíveis alterações histopatológicas no intestino de camundongos isogênicos que receberam, por gavagem, submetidos a duas diferentes doses de liriodenina.

4. Referências bibliográficas

1. Teixeira MM, Theodoro RC, Oliveira FF, Machado GC, Hahn RC, Bagagli E et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov: biological and clinical implications. *Med Mycol.* 2014; 52(1):19-28.
2. Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia. J Med Vet Mycol.* 1985; 23: 323-34.
3. Marques SA, Franco MF, Mendes RP, Silva NCA, Baccili C, Curcelli ED, et al. Aspectos epidemiológicos da paracoccidioidomicose na área endêmica de Botucatu (São Paulo-Brasil). *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1983; 25 (2): 87-92.
4. Lutz A. Uma mycose pseudococcidica localisada na bocca e observada no Brazil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. *Brazil Med.* 1908; 13: 121-24.
5. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. Micologia Médica. *In: Paracoccidioidomicose.* 8ª ed. São Paulo, Brasil: Editora Sarvier, 1991: 248-61.
6. Ajello L. Paracoccidioidomycosis: a historical review. *In: Paracoccidioidomycosis.* PAHO Sci. Publ.; 1972. p.254.
7. de Albornoz MB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Sabouraudia.* 1971; 9: 248-53.
8. Franco M, Bagagli E, Scapolio S, Lacaz CS. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. *Med Mycol.* 2000; 38: 185 – 91.
9. Restrepo A. Morphological aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* in lymph nodes: implications for the prolonged latency of paracoccidioidomycosis? *Med Mycol.* 2000; 38: 317-22.
10. Ricci G, Mota FT, Wakamatsu A, Serafim RC, Borra RC, Franco M. Canine

paracoccidioidomycosis. *Med Mycol.* 2004; 42: 379-83.

11. Grose E, Tamsitt JR. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. *Sabouraudia.* 1965; 4(2): 124-5.

12. Costa EO, Diniz LSM, Fava Netto C, Arruda C, Dagli MLZ. Delayed hypersensitivity test with paracoccidioidin in captive Latin America wild mammals. *J Med Vet Mycol.* 1995; 33: 39-42.

13. Naiff RD, Ferreira LCL, Barrett TV, Naiff MF, Arias JR. Paracoccidioidomycose enzoótica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no estado do Pará. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1986; 28(1): 19-27.

14. Franco M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol.* 1986; 25:5-18.

15. Camargo ZP, Franco MF. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol.* 2000; 17:41-48.

16. Loth GA, Santos JHF, de Oliveira CS, Uyeda H, Simão RCG, Gandra RF. Infection caused by the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *JMM Case Reports.* 2015. doi 10.1099/jmmcr.0.000016.

17. Theodoro RC, Teixeira M de M, Felipe MS, Paduan Kdos S, Ribolla PM, San-Blas G, et al. Genus paracoccidioides: species recognition and biogeographic aspects. *PLoS One.* 2012; 7(5):e37694.

18. Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJ, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol.* 2009; 52(2):273-83

19. Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota NGS. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras*

Med Trop. 1987; 20(2): 129-32.

20. Mendes RP. The gamut of clinical manifestations. *In*: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton: CRC Press; 1994. p. 233-58.

21. Manual de Vigilância e Controle da Paracoccidioidomicose. Secretaria de Estado da Saúde - Coordenadoria de Controle de Doenças - Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. São Paulo, 2008.

22. Coutinho Z F, Silva D, Lazéra M, Petri V, Oliveira R M, Sabroza P C, et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saúde Pública*. 2002; 18(5): 1441-54.

23. Azevedo PZ, Moris DV, Sylvestre TF, Levorato AD, Andrade JCBN, Cavalcante RS et al. Incidência da admissão de pacientes com paracoccidioidomicose de 1988 – 2012 em Serviço universitário da Região de Botucatu – São Paulo / Brasil. *Anais do XLIX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Campo Grande (MS), Brasil; 2013; resumo P-357*.

24. Rodrigues CC. Avaliação da infecção por *Histoplasma capsulatum* por meio de reações intradérmicas em moradores da zona urbana e rural do Município de Pratânia (SP) [Tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”; 2004.

25. Giraldo R, Restrepo A, Gutiérrez F, Robledo M, Londoño F, Hernández H, et al. Pathogenesis of paracoccidioidomycosis: a model based on the study of 46 patients. *Mycopathologia*. 1976; 58(2): 63-70.

26. Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun*. 1984; 46(2): 346-53.

27. Moreto TC. Diagnóstico da paracoccidioidomicose em pacientes atendidos em Serviços de rotina de hospital universitário [Dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”; 2011.
28. Borges-Walmsley MI, Chen D, Shu X, Walmsley AR. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiologia*. 2002; 10(2): 80-7.
29. Benard G, Hong MA, Del Negro GMB, Batista L, Shikanai-Yasuda MA, Duarte AJS. Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg*. 1996; 54(1): 7-12.
30. Benard G, Romano CC, Cacere CR, Juvenale M, Mendes-Giannini MJS, Duarte AJS. Imbalance of IL-2, IFN- γ and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine*. 2001; 13(4): 248-52.
31. Cabral-Marques O, Schimke LF, Pereira PV, Falcai A, de Oliveira JB, Hackett MJ et al. Expanding the clinical and genetic spectrum of human CD40L deficiency: the occurrence of PCM and other unusual infections in Brazilian patients. *J Clin Immunol*. 2012; 32: 212-20.
32. Cabral-Marques O, Arslanian C, Ramos RN, Morato M, Schimke L, Soeiro Pereira PV et al. Dendritic cells from X-linked hyper-IgM patients present impaired responses to *Candida albicans* and *P. brasiliensis*. *J Allergy Clin Immunol*. 2011.129(3):778-86.
33. Shimke-Marques LF, Cabral-Marques O, Hibbart J, Khan TA, Cavalcante RS, Borges Jr. E et al. A Novel defect of the IL12-IFN- γ axis: heterozygous *STAT4* mutation associated with susceptibility to paracoccidioidomycosis. *J Infect Dis* . In press 2017.
34. Bueno JP, Mendes-Giannini MJS, Del Negro GMB, Assis CM, Takiguti CK, Shikanai-Yasuda MA. IgG, IgM and IgA antibody response for the diagnosis and follow-up of paracoccidioidomycosis: comparison of counter immunoelectrophoresis and complement fixation. *J Med Vet Mycol*. 1997; 35: 213-17.

35. Mota NGS, Rezkallah-Iwasso MT, Peraçoli MTS, Audi RC, Mendes RP, Marcondes J, et al. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1985; 79: 765-72.
36. Biagioni L, Souza MJ, Chamma LG, Mendes RP, Marques SA, Mota NGS, Franco M. Serology of paracoccidioidomycosis. II. Correlation between class-specific antibodies and clinical forms of the disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1984; 78: 617 – 21.
37. Mendes RP, Cavalcante RS, Marques AS, Marques MEA, Venturini J, Sylvestre TF et al. Paracoccidioidomycosis: current perspectives from Brazil. *The Open Microbiol J.* 2017; 11:224-282.
38. Levorato AD, Moris DV, Cavalcante RS, Sylvestre TF, Azevedo PZ, Carvalho LR, Mendes RP. Evaluation of the hepatobiliary system in patients with paracoccidioidomycosis treated with cotrimoxazole or itraconazole. *Med Mycol.* 2017; 1-10.
39. Naranjo et al. Treatment of paracoccidioidomycosis with itraconazole. *J Med Vet Mycol.* 1990; 28:67-76.
40. Mendes RP, Barraviera B, Souza LR, Pereira PCM, Marcondes-Machado J, Franco MF, et al. Evaluation of itraconazole in the treatment of paracoccidioidomycosis (PBM). *Rev Argent Micol.* 1992;15-86.
41. Cronquist A. The evolution and classification of flowering plants. 2th ed. New Yor: New York Botanical Garden; 1988.
42. Chatrou LW, Pirie MD, Erkens RHJ, Couvreur TLP, Neubig KM, Abbott JR et al. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant Family *Annonaceae* informed by molecular phylogenetics. *Bot J Linn Soc.* 2012; 169:5-40.
43. Standley PC, Steyermark JA. *Annonaceae: flora de Guatemala.* Fieldiana: Botany; 1946.
44. Maas P, Lobão A, Rainer H. *Annonaceae in Flora do Brasil 2020 em construção.* Jardim

Botânico do Rio de Janeiro; Acesso em 05 Set.2017. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110219>>.

45. Lemos EEP. Panorama de las anonas cultivadas em Brasil: saramuyo, guanábana y atemoya. In: González-Esquinca AR, Luna-Cazáres LR, Gutiérrez-Jiménez J, Schlie-Guzmán MA, Vidal-López DG. Anonáceas Plantas antiguas, estudios recientes. 1.Tuxtla Gutiérrez:Unicach; 2011.21-33.

46. Andrés-Agustín J. Diversidad de géneros y especies de Annonaceae en México. In: González-Esquinca AR, Luna-Cazáres LR, Gutiérrez-Jiménez J, Schlie-Guzmán MA, Vidal-López DG. Anonáceas Plantas antiguas, estudios recientes. I.Tuxtla Gutiérrez: Unicach; 2011.79-89.

47. Leboeuf M, Cavé A, Bhaumik PK, Mukherjee B, Mukherjee R. The phytochemistry of the *Annonaceae*. *Phytochemistry*. 1982; 21(12): 2783-2813.

48. Alali FQ, Liu XX, McLaughlin JL. Annonaceous acetogenins: recent progress. *J Nat Products*.1999; 62:504-540.

49. Hufford CD, Funderburk MJ, Morgan JM, Robertson LW. Two antimicrobial alkaloids from heartwood of *Liriodendron tulipifera* L. *J. Pharm. Sci.* 1975; 64:789 – 792.

50. Hufford CD, Sharma AS, Oguntimein BO. Antibacterial and antifungal activity of liriodenine and related oxoaporphine alkaloids. *J Pharm Sci.* 1980;69:1180–1183.

51. Graziose R, Rathinasabapathy T, Lategan C, Poulev A, Smith PJ, Grace M et al. Antiplasmodial activity of aporphine alkaloids and sesquiterpene lactones from *Liriodendron tulipifera*. *J Ethnopharmacol.* 2011; 133(1):26-30.

52. Costa EV, da Cruz PE, de Lourenço CC, de Souza Moraes VR, de Lima Nogueira PC, Salvador MJ. Antioxidant and antimicrobial activities of aporphinoids and other alkaloids from the bark of *Annona salzmannii* A. DC. (*Annonaceae*). *Nat Prod Res.* 2013; 27: 1002-

1006.

53. da Silva EBP , Soares MG , Mariane B , Vallim MA ,Pascon RC et al. The Seasonal Variation of the Chemical Composition of Essential Oils from *Porcelia macrocarpa* R.E. Fries (*Annonaceae*) and Their Antimicrobial Activity. *Molecules*. 2013; 18:13574-13587.
54. Akendengue B, Champy P, Nzamba J, Roblot F, Loiseau PM, Bories C. Antifungal and anthelmintic activities of *Cleistopholis patens* (*Annonaceae*). *Planta Med*. 2009;75(10):1143-1145.
55. Okechukwu DC, Momoh MA, Esimone CO. Evaluation of the anti-candidal activity of methanolic leaf extract of *Cleistopholis patens* (fam. *Annonaceae*) on candida species isolated from stage II HIV patients. *Afr Health Sci*. 2015;15(3):789-796.
56. Pinho FVS de A, da Cruz LC, Rodrigues NR, et al. Phytochemical Composition, Antifungal and Antioxidant Activity of *Duguetia furfuracea* A. St.-Hill. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7821051>.
57. da Silva Almeida JRG, Facanali R, Vieira MAR, et al. Composition and Antimicrobial Activity of the Leaf Essential Oils of *Duguetia gardneriana* Mart. and *Duguetia moricandiana* Mart. (*Annonaceae*). *J Essent Oil Res*. 2010;22(3):275-278.
58. Padmaja V, Thankamany V, Hara N, Fujimoto Y, Hisham A. Biological activities of *Annona glabra*. *J Ethnopharmacol*. 1995;48(1):21-24.
59. Jamkhande PG, Wattamwar AS, Pekamwar SS, Chandak PG. Antioxidant, antimicrobial activity and in silico PASS prediction of *Annona reticulata* Linn. root extract. *J Basic Appl Sci*. 2014;3(2):140-148.
60. M de Q P, Barbosa-Filho JM, Lima EO, Maia RF, Barbosa R de C, Kaplan MA. Antimicrobial activity of benzyloquinoline alkaloids from *Annona salzmanii* D.C. *J Ethnopharmacol*. 1992;36(1):39-41.

61. Rahman MM, Parvin S, Haque ME, Islam ME, Mosaddik MA. Antimicrobial and cytotoxic constituents from the seeds of *Annona squamosa*. *Fitoterapia*. 2005;76(5):484-489.
62. Lima LAR dos S, Johann S, Cisalpino PS, Pimenta LPS, Boaventura MAD. *In vitro* antifungal activity of fatty acid methyl esters of the seeds of *Annona cornifolia* A.St.-Hil. (*Annonaceae*) against pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011; 44(6):777-780.
63. Lima LAR dos S, Alves TMA, Zani CL, et al. *In vitro* cytotoxic, antifungal, trypanocidal and leishmanicidal activities of acetogenins isolated from *Annona cornifolia* A. St. -Hil. (*Annonaceae*). *An Acad Bras Cienc*. 2014; 86(2):829-839.

Capítulo II

Artigo I - Atividade antifúngica da liriodenina sobre fungos do gênero *Paracoccidioides* e outros fungos causadores de micoses sistêmicas.

Adrielle Dandara Levorato¹, Iván de la Cruz Chacón², Julhiany de Fátima da Silva¹, Gisela Ferreira³, Daniela Carvalho dos Santos³, Daniela Vanessa Moris⁴, Camila Marçon¹, Ricardo de Souza Cavalcante¹, Rinaldo Poncio Mendes¹

¹ Departamento de Doenças Tropicais - Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Estado de São Paulo, Botucatu, Brasil; ² Instituto de Ciências Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Chiapas, México; ³ Departamento de Botânica - Instituto de Biociências de Botucatu - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Estado de São Paulo, Botucatu, Brasil; ⁴ Departamento de Imunologia e Microbiologia – Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Estado de São Paulo, Presidente Prudente, Brasil.

Resumo. A paracoccidioidomicose (PCM) é micose granulomatosa sistêmica causada por fungos do gênero *Paracoccidioides*. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade da liriodenina extraída de *Annona macrophyllata* Donn. Sm sobre fungos do gênero *Paracoccidioides* e outros fungos causadores de micoses sistêmicas. A concentração inibitória mínima (CIM) da liriodenina foi determinada pelo método de microdiluição, assim como a concentração fungicida mínima. As alterações celulares causadas pela liriodenina em *P. brasiliensis* (Pb18) foram avaliadas pela microscopia eletrônica de transmissão (MET) e de varredura (MEV). A liriodenina revelou atividade sobre fungos do gênero *Paracoccidioides*, (CIM entre 31,2 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e sobre a cepa de *Histoplasma capsulatum* (CIM de 1,95 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). No entanto, a atividade também foi observada sobre leveduras das espécies *Candida* spp (CIM de 125 a 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), porém com maior atividade sobre as cepas de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (CIM de 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Deve-se destacar a

ação sobre *C. krusei* que é intrinsecamente resistente ao fluconazol. A lirioidenina revelou atividade fungicida sobre todas as cepas padrão e isolados clínicos que foram inibidos *in vitro*. A microscopia eletrônica revelou alterações citoplasmáticas e danos na parede celular em *P. brasiliensis*. Os resultados indicam que a lirioidenina é uma alternativa promissora no tratamento das micoses sistêmicas.

Palavras-chave: lirioidenina, paracoccidioidomicose, micoses sistêmicas, compostos antifúngicos, compostos antimicrobianos, plantas medicinais.

Introdução

A paracoccidioidomicose (PCM) é micose sistêmica confinada à América Latina, causada por fungos termodimórficos que se classificam em duas espécies, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*.^{1,2} Esses fungos são os principais agentes de micoses endêmicas dessa região.¹

A incidência de infecções fúngicas tem revelado um aumento dramático nas últimas décadas, criando sérios problemas para o atendimento de pacientes imunossuprimidos, com micoses sistêmicas^{3,4,5,6}. Nesse mesmo período, observou-se grande dissociação no desenvolvimento de compostos para o manuseio de infecções fúngicas em relação às bacterianas. Enquanto foi evidente o crescimento do número de compostos com ação antibacteriana, poucos antifúngicos foram disponibilizados.^{7,8}

Os estudos para desenvolvimento de novos fármacos, obtidos de extratos vegetais, têm aumentado nos últimos anos^{9,10,11}. As plantas possuem diversos componentes com propriedades biológicas e atividade em doenças de diferentes etiologias – inflamatória, infecciosa e tumoral. A lirioidenina (**Figura 1**), alcaloide oxoaporfínico com propriedades antibacteriana, antifúngica, antiprotozoária e citotóxica, tem sido isolada de plantas de várias famílias.¹²⁻¹⁸

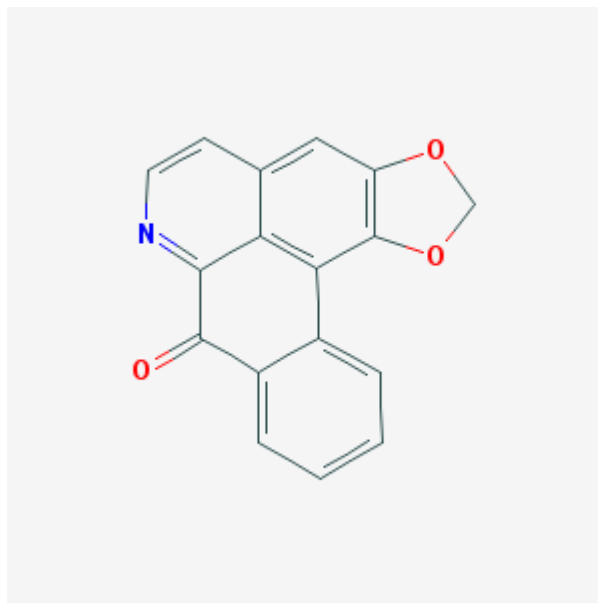


Figura 1. Estrutura química da liriodenina.

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* da liriodenina sobre fungos do gênero *Paracoccidioides* e outros agentes causadores de micoses sistêmicas e as alterações morfológicas por ela causadas em isolados de *P. brasiliensis*.

Material e Métodos

Microrganismos. Cepas provenientes da *American Type Culture Collection* - ATCC e isolados clínicos do Laboratório de Pesquisa em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu foram utilizados nesse estudo. Entre os primeiros, foram avaliados fungos do gênero *Paracoccidioides* - *P.brasiliensis*: Pb18 (coleção de fungos da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, SP, Brasil / forma clínica crônica), Pb192 (coleção de fungos da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, SP, Brasil / forma clínica desconhecida) e Pb 339 (ATCC 32069 / forma clínica crônica) e *P. lutzii* : PL01 (ATCC MYA-826 / forma clínica desconhecida) e PL8334 (forma clínica desconhecida); entre os isolados clínicos, os de números 234, 326 e 531. As seguintes cepas foram utilizadas como representativas de fungos

que podem causar outras micoses sistêmicas: *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida tropicalis* (ATCC 750), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Cryptococcus neoformans* (ATCC 28957), *Cryptococcus gattii* (AFLP4), *Histoplasma capsulatum* (ATCC 26029) e *Aspergillus fumigatus* (ATCC 7100).

Relatos de caso

Caso 1. LM, sexo masculino, 53 anos, com paracoccidioidomicose forma crônica, com comprometimento pulmonar e mucosa de vias aerodigestivas superiores. Apresentava-se com lesões moriformes, vegetante verrucosas, dolorosas em língua, associada a tosse com expectoração esbranquiçada, febre noturna e perda ponderal de 20 kg em 4 meses. O exame de tomografia de tórax revelava a presença de nódulos centrilobulares e subpleurais difusos bilaterais. A pesquisa de anticorpos anti *P. brasiliensis* pela reação de imunodifusão dupla em gel de ágar (IDD) foi positiva com titulação de 1/4. O exame histopatológico de lesão de língua e o citopatológico de escarro, com utilização da coloração de Gomori-Grocott, foram conclusivos para a doença assim como a cultura de tecido (isolado nº234). O paciente recebeu tratamento intravenoso com a associação sulfametoxazol 1200 mg – timetoprim 240 mg a cada 12 horas por 15 dias com melhora clínica parcial. Após alta hospitalar perdeu o seguimento médico.

Caso 2. MSC, sexo feminino, 20 anos, com paracoccidioidomicose forma aguda grave, com comprometimento de linfonodos e mucosa de vias aerodigestivas superiores. Apresentava-se com linfonodos tumorais em cadeias cervicais anteriores, submandibulares e occipital, além de febre, lesão em mucosa oral e emagrecimento de 20 kg em 3 meses. A pesquisa de anticorpos anti *P. brasiliensis* pela IDD foi positiva com titulação de 1/4. O diagnóstico foi confirmado pelo exame histopatológico de lesão de mucosa, citopatológico de aspirado de

linfonodo e cultura de escarro (isolado nº326). Recebeu tratamento com a associação sulfametoxazol 1200 mg – timetoprim 240 mg a cada 12 horas, evoluindo com cura clínica e sorológica.

Caso 3. CDN, sexo masculino, 59 anos, com paracoccidioidomicose forma crônica moderada com comprometimento de mucosas de vias aerodigestivas superiores, intestino e testículo. Apresentava-se com edema testicular há 6 meses, com progressão para fistulização, além de perda ponderal de 5 kg. Há 1 mês da admissão surgiram lesões moriformes em palato mole e mucosa jugal. A pesquisa de anticorpos anti *P. brasiliensis* pela IDD foi positiva com titulação de 1/16. O diagnóstico foi confirmado pelo exame micológico direto e cultura do conteúdo de fistulização testicular e pelo exame histopatológico de lesão de mucosa (isolado nº 531). Recebeu tratamento com itraconazol via oral 200 mg ao dia. Dois meses após o início da terapia antifúngica, o paciente evoluiu com perfuração intestinal, quando foi identificado o comprometimento de trato digestório. O paciente já obteve cura clínica, porém permanece sob terapia antifúngica, pois ainda não alcançou a cura sorológica.

Extração da liriodenina. As raízes de *Annona macrophyllata* Donn. Sm. foram coletadas em Tuxtla Gutiérrez, Chiapas (México) e identificadas no Herbário Eizi Matuda da Universidade de Ciências e Arte de Chiapas, com o número de coleção 352. As raízes foram secas em temperatura ambiente e moídas em moinho de faca. A extração de alcaloides foi realizada pelo método seletivo ácido-base. As amostras moídas foram umedecidas com solução saturada de Na₂CO₃ e deixadas para secar por 48 horas, em temperatura ambiente. A extração dos alcaloides foi feita com CHCl₃, sob constante agitação por duas horas e filtrados para obtenção da fase clorofórmica. Após esse período, o extrato clorofórmico foi extraído com 1M HCl e a fase aquosa foi alcalinizada para pH 9,5 com solução de Na₂CO₃ e, depois, extraída novamente com CHCl₃. Para obter o extrato total de alcaloides, o solvente foi

rotoevaporado. Para a extração da lirioidenina o extrato bruto de alcaloide foi filtrado em sistema a vácuo em kitasato com papel filtro e analisado em High Performance Liquid Chromatography (HPLC) . Para o experimento utilizaram-se 100 g de massa seca de raízes, com rendimento de 100 mg de lirioidenina. ¹⁶

Teste de sensibilidade. O teste de sensibilidade foi realizado pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM), por teste de referência por microdiluição. Ele foi realizado com a lirioidenina em todos os microrganismos e comparado com a de compostos antifúngicos considerados padrão para cada gênero – fluconazol (FLC) e anfotericina B (AmB). O teste de microdiluição para fungos do gênero *Paracoccidioides* foi realizado seguindo o documento M27-A3 do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), modificado por Paula e Silva et al. ¹⁹. O teste para leveduras foi realizado de acordo com o método de microdiluição, segundo as especificações do European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST ²⁰. O teste de sensibilidade para fungos filamentosos foi realizado de acordo com o documento M38-A2 do Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI (2008) ²¹. O teste de sensibilidade para *Histoplasma capsulatum* foi avaliado pelo método de microdiluição de acordo com o protocolo descrito no documento M27-A2, padronizado pelo CLSI (2002), modificado por Brilhante et al. ²²

A lirioidenina foi dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO). Foram realizadas diluições seriadas, utilizando-se o meio RPMI-1640 como diluente, mantendo-se um volume constante de 1mL por tubo. A lirioidenina foi testada a partir da solução estoque de 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em 10 concentrações que variaram de 500 a 0,97 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Volumes de 100 μL de cada diluição foram distribuídos em microplacas com 96 poços. Os antifúngicos comerciais AmB (Sigma) e FLC (Sigma) foram incluídos como controles antifúngicos positivos. As concentrações finais variaram de 16 a 0,03 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para AmB e de 128 a 0,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para FLC. As suspensões

de células da fase leveduriforme de cepas padrões e isolados clínicos de fungos do gênero *Paracoccidioides* foram ajustadas para concentração final de 1×10^6 células/mL em meio RPMI-1640 suplementado com 2% de glicose e adicionados 100 μ L a cada orifício da placa contendo liriodenina e antifúngico. As placas foram incubadas a 37°C, em um período de 72 horas, com agitação de 150 rpm. Após 48 horas de incubação, foram adicionados 20 μ L do corante Alamar Blue (Invitrogen) em todos os poços e as placas foram mantidas por mais 24 horas. Os testes foram realizados em triplicata para todos os fungos. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada visualmente após 72 horas de incubação através da observação da coloração do corante. As leituras das placas foram realizadas da maior para a menor concentração.

Concentração fungicida mínima - CFM. Após a determinação da CIM, foram realizados subcultivos de todos os poços das microplacas contendo as concentrações maior ou igual as da CIM. Aliquotas de 100 μ L de cada poço foram retiradas e plaqueadas em meio *brain heart infusion*-BHI (Difco) contendo gentamicina a 0,5%, 4,0% de soro de cavalo e filtrado de cultura da cepa Pb 339 para fungos do gênero *Paracoccidioides*²³. O ágar Sabouraud foi utilizado para os demais fungos. As placas foram incubadas de acordo com o tempo específico de cada microrganismo. A CFM foi definida como a menor concentração da liriodenina com ≤ 1 colônia visível no meio de cultivo após o período de incubação.

Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP.

A cepa Pb 18 foi tratada com a CIM da liriodenina em placa de 24 poços. Os volumes finais de liriodenina e inóculo foram ajustados para 1 mL e, após 48 horas de incubação a 37°C, adicionou-se o fixador de Karnovsky.

O material foi retirado do fixador e lavado três vezes por 5 minutos cada, em tampão fosfato 0,1M pH 7,3. Após esse período, o material foi imerso em tetróxido de ósmio 0,1M pH7,3 por duas horas. Posteriormente, o material foi lavado três vezes por 10 minutos cada, em água destilada e imerso em acetato de uranila a 0,5% por cerca de duas horas. Uma série de desidratação crescente em acetona foi realizada e, a seguir, o material foi adicionado a uma mistura 1:1 de resina Araldite®+ acetona 100% e deixado por 12 horas em temperatura ambiente. O material foi adicionado à resina pura por cerca de uma hora a 37°C e emblocado. Foram realizados cortes ultrafinos (90nm) e contrastados com acetato de uranila em álcool 50% durante 20 minutos e, depois, contrastados em citrato de chumbo por 10 minutos e observado em microscópio eletrônico Tecnai Spirit - FEI Company.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a realização da MEV, no mesmo Centro, a cepa Pb 18 foi cultivada em meio RPMI-1640 a 2% de glicose e tratada com a CIM da liriodenina em lamínulas recobertas com poli-L-lisina durante 48 horas, a 37°C. Após esse período o meio foi retirado e, a seguir, adicionou-se o fixador de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3 por 30 minutos. O fixador foi retirado dos poços e as lamínulas foram lavadas três vezes por 5 minutos cada, em água destilada. Adicionou-se o tetróxido de ósmio 0,5% 0,1M pH 7,3 em água destilada, por 40 minutos. Após esse período, retirou-se o tetróxido de ósmio e as lamínulas foram novamente lavadas três vezes por 10 minutos cada, em água destilada. Uma série de desidratação crescente de álcool foi realizada e, a seguir, as lamínulas foram levadas ao ponto crítico, montadas em “*stubs*” e metalizadas. As imagens foram realizadas em microscópio EVO LS 15 ZEISS.

Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina

de Botucatu – UNESP, pelo parecer número 2.257.787 (**Anexo 1**).

Resultados

Concentração inibitória mínima. A tabela 1 apresenta os resultados da atividade antifúngica da liriodenina, isolada de *Annona macrophyllata*.

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) da liriodenina, obtida de *Annona macrophyllata*, avaliada em 17 isolados fúngicos.

Fungo	Liriodenina		Anfotericina B		Fluconazol	
	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CFM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CFM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CFM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> 339	>500	>500	8	8	NR	NR
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> 18	31,2	31,2	1	1	NR	NR
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> 192	62,5	62,5	1	1	NR	NR
<i>Paracoccidioides lutzii</i> 01	>500	>500	1	8	NR	NR
<i>Paracoccidioides lutzii</i> 8334	>500	>500	1	1	NR	NR
<i>Paracoccidioides</i> sp 234	>500	>500	1	1	NR	NR
<i>Paracoccidioides</i> sp 531	250	500	0,5	1	NR	NR
<i>Paracoccidioides</i> sp 326	>500	>500	0,5	2	NR	NR
<i>Histoplasma capsulatum</i> (ATCC 26029)	1,95	3,90	1	1	NR	NR
<i>Aspergillus fumigatus</i> (ATCC 7100)	>500	>500	1	1	NR	NR
<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)	125	250	1	1	0,25	–
<i>Candida glabrata</i> (ATCC 90030)	125	500	1	1	16	–
<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22019)	250	500	0,125	0,125	1,0	–
<i>Candida krusei</i> (ATCC 6258)	250	500	1	1	64,0	–
<i>Candida tropicalis</i> (ATCC 750)	>500	>500	0,5	0,5	1,0	–
<i>Cryptococcus neoformans</i> (ATCC 28957)	62,5	125	0,25	0,25	8	–
<i>Cryptococcus gattii</i> (ATCC AFLP4)	62,5	125	1	1	4	–

NR: não realizado, por não ser antifúngico de referência.

Das oito amostras de fungos do gênero *Paracoccidioides*, somente as cepas Pb18 e Pb192 e o isolado clínico 531 foram sensíveis à liriodenina às concentrações avaliadas, com CIMs de 31,2, 62,5 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. As demais cepas e isolados foram resistentes à maior concentração avaliada.

Em relação às leveduras utilizadas no ensaio, a liriodenina revelou atividade antifúngica contra a maioria das cepas testadas, quando comparada com os controles

antifúngicos AmB e FLC, exceto para *Candida tropicalis* que mostrou ser resistente para a maior concentração avaliada.

A liriodenina não demonstrou atividade antifúngica sobre a cepa de *Aspergillus fumigatus*. No entanto, a cepa de *Histoplasma capsulatum* revelou-se sensível à liriodenina na concentração de $1,95 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Concentração fungicida mínima (CFM). A liriodenina revelou atividade fungicida sobre todas as cepas padrão e isolados clínicos que foram inibidos *in vitro*. A CFM foi igual à CIM em todos os fungos avaliados, com exceção de *Histoplasma capsulatum* e *Candida Krusei* (tabela 1).

Microscopia eletrônica de varredura

A ultraestrutura de células da fase leveduriforme de *P. brasiliensis* (Pb18) revelou células isoladas e, ou, em agrupamentos com vários brotamentos (**Figuras 2 e 3**).

A microscopia eletrônica (MEV) de varredura das células da fase leveduriforme, sem tratamento com liriodenina, revelou superfícies levemente irregulares e prolongamentos que aderem as células à sua superfície de contato, no caso a placa de cultura. Os prolongamentos apresentaram-se curtos e com morfologia regular e delicada, sendo visualizados bem próximos ao corpo celular, similar a um “halo” ao redor da célula. Em células isoladas observam-se discretas irregularidades em sua superfície, semelhantes a “nervuras” e também foi possível detectar uma região filamentar (ligamento), que foi interpretada como o início do aparecimento de um brotamento (**Figuras 2A e 2B**); em outras imagens notaram-se agrupamentos de células com vários ligamentos aos seus brotamentos (Figuras 2C e 2D).

A morfologia ultraestrutural, após tratamento com liriodenina na CIM ($31,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$), apresentou alterações (**Figuras 2E, 2F, 2G e 2H**). Em células isoladas raramente observou-se o “halo” de aderência ao meio de cultura, apesar de a morfologia da célula ser semelhante àquela vista nas células sem tratamento, no que se refere ao formato arredondado da célula e as discretas

irregularidades de superfície (“nervuras”) (**Figura 2E**). Entretanto, as alterações ultraestruturais mais evidentes foram observadas em agrupamentos de células, onde foi possível visualizar células muito deformadas, com ligamentos irregulares e placas de material justaposto a esses agrupamentos, aparentemente sem membrana de revestimento (**Figuras 2F, 2G e 2H**).

Microscopia eletrônica de transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão (MET), de células sem tratamento com liriodenina, revela formas arredondadas, com contornos regulares e paredes celulares de espessura uniforme. O núcleo e as organelas mostraram-se preservados e íntegros, notando-se a presença de mitocôndrias, discreto retículo endoplasmático e vacúolos de tamanhos e conteúdos variados. Alguns vacúolos menores são elétron-lucos e demonstram ausência de material visível em seu interior; porém, a grande maioria dos vacúolos observados no citoplasma das células são densos circulares, preenchidos por material finamente floculado, de aspecto homogêneo com discreta densidade. Foi possível a detecção dos ligamentos entre células e seus brotamentos (Figuras 3A, 3B e 3C).

No entanto, as células tratadas com liriodenina apresentam morfologia bastante alterada, como se observou na MEV, porém com detalhamento das alterações citoplasmáticas e nucleares. As células se apresentam com forma alterada, não sendo possível a visualização de formas arredondadas e sim irregulares, geralmente com depressões em suas paredes, acompanhadas pela membrana plasmática da célula, exibindo formas variadas, predominando o formato de foice. As alterações citoplasmáticas foram muito evidentes e, entre elas, foi possível a observação de grandes áreas citoplasmáticas sem contorno definido, preenchidas por material finamente floculado, de aspecto homogêneo e discreta densidade, semelhante ao material observado no interior dos vacúolos densos circulares do grupo controle. Tais imagens sugerem a fusão de vários destes vacúolos, nas células tratadas. Além disso, é possível notar grandes vacúolos contendo esse mesmo

material com formados irregulares e, inclusive, formas triangulares (**Figuras 3D, 3E, 3F, 3G, 3H, 3I, 3J e 3K**).

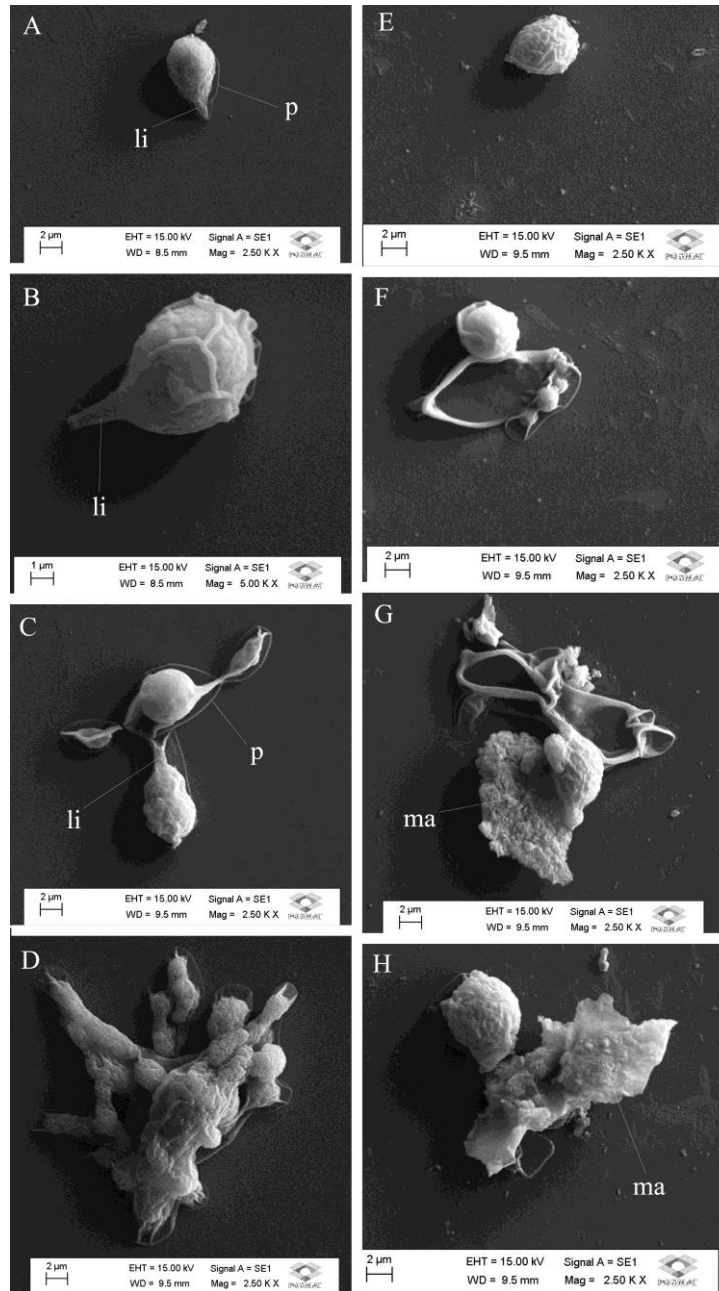


Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura da fase leveduriforme da cepa padrão *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18). A-D - células não tratadas com liriodenina; E-H - células tratadas com liriodenina na CIM de 31,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; li - ligamento; p - prolongamento; ma - material justaposto.

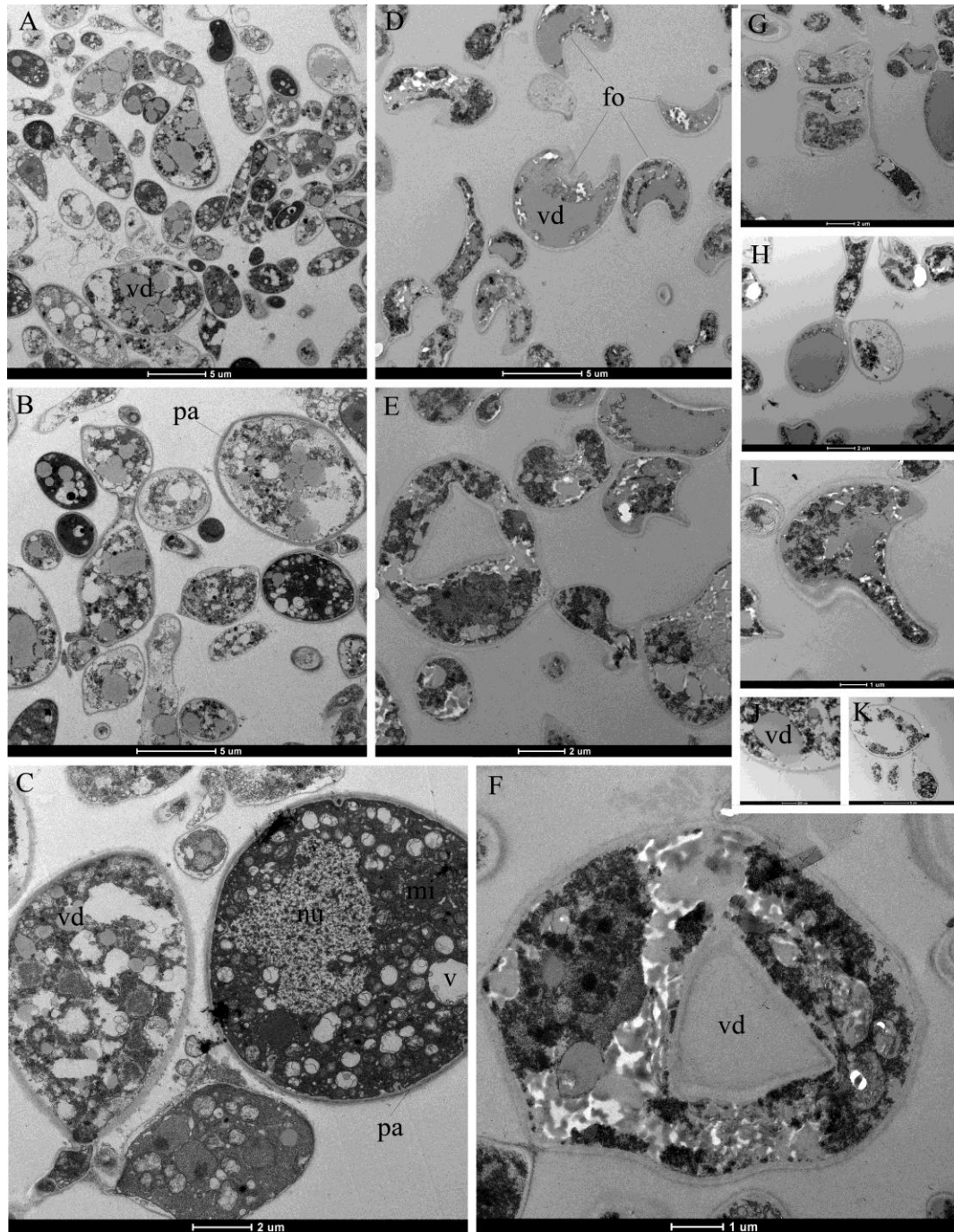


Figura 3. Microscopia eletrônica de transmissão da fase leveduriforme da cepa padrão *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18). A – C: células não tratadas com liriodenina; D – K: células tratadas com liriodenina na CIM de $31,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$; vd – vacúolo denso; v – vacúolo elétron-luscente; nu – núcleo; mi – mitocôndria; pa – parede celular; fo – “forma de “foice””.

Discussão

Apesar da contribuição trazida pelos novos compostos antifúngicos, alguns problemas persistem, como a baixa excreção urinária em natureza, dificultando o tratamento de infecções do trato urinário, a pequena difusão para o líquido céfalo-raquidiano, a interação medicamentosa com vários fármacos utilizados no tratamento da aids e de outras doenças infecciosas e não infecciosas e a indicação no tratamento de grávidas^{24,25,26,27}. Essas dificuldades também justificam a pesquisa constante de novos compostos antifúngicos, inclusive os de origem vegetal.

A utilização de extratos vegetais para tratamento e profilaxia de doenças é uma das práticas mais antigas da humanidade. Com o aumento da resistência aos compostos antimicrobianos, os efeitos indesejáveis sobre os pacientes e a interação medicamentosa, a busca de novos fármacos de origem vegetal tem aumentado muito nos últimos anos^{28,29}. A maior vantagem desta abordagem sobre a modificação de compostos já existentes é a probabilidade de se identificar novos protótipos de drogas, com estrutura química bastante diferentes, evitando a resistência cruzada e as interações medicamentosas atuais.¹⁸

Poucos estudos avaliaram a ação de compostos derivados de vegetais sobre fungos patogênicos. O presente estudo revelou que a liriodenina possui ação antifúngica sobre três cepas de fungos do gênero *Paracoccidioides*, porém maior atividade sobre leveduras dos gêneros *Cryptococcus* e sobre o fungo termodimórfico *Histoplasma capsulatum*.

Entre os estudos que focalizaram o gênero *Paracoccidioides*, dois utilizaram extratos derivados do gênero *Annona*^{30,31} e três avaliaram compostos extraídos de outras espécies vegetais.^{32,33,34}

Lima et al.³⁰ avaliaram, pelo teste de microdiluição em caldo, a ação de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) de *Annona cornifolia* A.St.-Hil sobre 12 isolados clínicos

de *P. brasiliensis*, observando inibição de todos eles, com valores da CIM entre 3,4 e 55,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Esses resultados foram similares aos do presente estudo, em relação à faixa de variação da CIM.

Lima et al.³¹ também avaliaram a ação de acetogeninas, extraídas de *Annona cornifolia* A.St.-Hil, pelo método de microdiluição em caldo, sobre as cepas Pb01 e Pb18, em concentrações que variaram de 1,17 a 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As acetogeninas demonstraram atividade sobre as duas cepas, em concentração $\leq 150 \mu\text{g.mL}^{-1}$, mostrando-se mais ativas do que a associação sulfametoxazol-trimetoprim, porém, menos que a anfotericina B.

San-Blas et al.³² demonstraram, pelo método do peso seco, que o ajoene - composto sulfurado presente no alho (*Allium sativum*), na concentração de 11,7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, inibiu 90% do crescimento da fase leveduriforme e 60% da forma micelial de *P. brasiliensis*. A microscopia eletrônica revelou que 11,7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ajoene afetaram a integridade da membrana citoplasmática do fungo, mas a lise celular só foi observada na concentração de 46,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

As frações hexânicas de extratos hidroalcoólicos de *Baccharis dracunulifolia* e *Piper regnelli* apresentaram ação antifúngica sobre três cepas do complexo *P. brasiliensis* (Pb18, Pb01 e Pb339). Os compostos da espécie *Baccharis dracunulifolia* apresentaram atividade sobre as cepas Pb 18, Pb01 e Pb339, com CIMs de 7,8, 7,8 e 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, enquanto os da espécie *Piper regnelli* revelaram CIM de 7,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ sobre as três cepas avaliadas³³. Comparando-se esses resultados com os do presente estudo, observa-se que a cepa Pb 339 mostrou-se resistente à liriiodenina, mas sensível às frações hexânicas, enquanto a cepa Pb 18 foi mais sensível à liriiodenina.

As substâncias maitenina e pristimerina, derivadas de *Maytenus ilicifolia*, revelaram ação antifúngica sobre leveduras e fungos filamentosos. A cepa Pb18 foi sensível na concentração de $<0,12 \text{ mg.L}^{-1}$ de ambas as substâncias. A maitenina revelou melhores

resultados que a pristimerina. Não se observou efeito citotóxico desses compostos sobre queratinócitos da mucosa oral, sugerindo grau de segurança adequado.³⁴

Os dados ultraestruturais das células da fase leveduriforme da cepa padrão *P.brasiliensis* (Pb18) tratadas com lirioidenina revelaram alterações principalmente na parede celular, seguida de alterações citoplasmáticas. Achados similares foram relatados com ajoene - dano da parede celular, lise celular e deterioração de estruturas em células da fase leveduriforme de *P. brasiliensis*.³²

Este estudo revelou CIM de lirioidenina sobre a cepa ATTC 26029 de *Histoplasma capsulatum* na concentração de 1,95 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Alanís-Garza et al.³⁵ demonstraram a atividade antifúngica dos extratos de hexano, acetato de etila e butanol extraídos de 15 plantas da região nordeste do México sobre *Histoplasma capsulatum*, com valores de CIM entre 16 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Valores de CIM ainda menores foram observados com maitenina (0,97 mg.L^{-1}) e pristimerina (0,48 mg.L^{-1}).³⁴

Nos últimos anos, observou-se o aumento de infecções invasivas causadas por leveduras do gênero *Candida*, principalmente em pacientes imunossuprimidos³⁶. A *C. albicans* é a principal responsável pelas candidemias, embora venha aumentando a prevalência da etiologia não- *C.albicans*³⁷. A sensibilidade das espécies de *Candida* aos compostos antifúngicos de uso habitual é variável - *C. krusei* apresenta resistência intrínseca ao fluconazol³⁸, enquanto a *C. glabrata* exibe resistência adquirida.³⁹

No presente estudo, a lirioidenina revelou atividade antifúngica sobre a maioria das cepas de *Candida*, com CIMs entre 125 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, com exceção da *C. tropicalis*, que se revelou resistente ao alcaloide. Esses resultados foram similares aos observados com pristimerina³⁴, com valores de CIM entre 7,81 e 250 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e com o extrato hexânico de *Annona glabra* L.⁴⁰, que inibiu o crescimento de *C. albicans* na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

O presente estudo também revelou que a liriodenina apresenta menores valores de CIM que os do extrato metanólico e do acetato de etila obtidos de *Duguetia furfuraceae* sobre cepas de *C. albicans* e *C. krusei*, (CIM $\geq 1024 \mu\text{g.mL}^{-1}$), embora atuando sobre a *C. tropicalis*⁴¹. A liriodenina também se revelou mais ativa que os ésteres metílicos de ácidos graxos de *Annona cornifolia* ($\geq 500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) sobre cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*³⁰.

A criptococose é uma das principais micoses que acometem indivíduos imunossuprimidos, em especial os infectados pelo vírus da imunodeficiência humana, pela gravidade das manifestações clínicas, incidência e intensidade das sequelas e pela elevada letalidade⁴². O tratamento da meningite criptocócica deve ser feito com a associação da anfotericina B ou dos seus derivados lipídicos com a flucitosina. No entanto, a anfotericina B clássica exige administração intravenosa e cuidadoso controle de seus efeitos colaterais; os derivados lipídicos da anfotericina B têm custo elevado e o tratamento também exige a administração intravenosa, embora sejam menos tóxicos; por fim, a flucitosina não se encontra disponível em muitos países, inclusive no Brasil. Essas dificuldades levaram ao uso de doses elevadas de fluconazol, que é fungistático e que proporciona um lento clareamento da infecção. Esse cenário estimulou a investigação de outros esquemas terapêuticos com os compostos antifúngicos disponíveis, à associação de antifúngicos com imunomoduladores e à busca de outros fármacos com atividade anti-criptocócica.⁴³⁻⁴⁶

No presente estudo, a liriodenina revelou atividade sobre isolados dos dois complexos, *C. neoformans* e *C. gattii*, com CIMs de $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para ambas. A CIM observada no presente estudo foi bem menor que a dos ésteres metílicos de ácidos graxos de *Annona cornifolia* A.St.-Hil³⁰, que se revelaram iguais ou superiores a $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e aos três componentes de *Ocimum basilum* - óleo essencial, extrato etanólico bruto e fração hexânica, com CIMs de 156 a $2500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ⁴⁷. No entanto, os valores da CIM da maitenina - 0,48 a 3,9

mg.L⁻¹ e da pristimerina - 0,97 a 7,8 mg.L⁻¹ foram ainda menores.³⁴

Aspergillus fumigatus é o principal agente de aspergilose invasiva, observada em pacientes neutropênicos^{48,49}, cujo tratamento é feito principalmente com compostos triazólicos, tais como voriconazol e posaconazol⁵⁰. No entanto, estudos de vigilância revelaram a emergência de isolados clínicos e ambientais resistentes em todo o mundo⁵¹⁻⁵⁶, em especial em pacientes que fizeram uso prévio de azólicos⁵⁷ ou infectados por fungos expostos a derivados azólicos utilizados na agricultura^{57,58}. No presente estudo, a liriodenina não apresentou atividade antifúngica sobre a cepa de *Aspergillus fumigatus*, mas a maitenina, na concentração de 125 mg.L⁻¹ e a pristimerina, na de 250 mg.L⁻¹, revelaram-se ativas sobre este fungo, cabendo à maitenina a melhor atividade fungicida³⁴.

O mecanismo de ação antifúngica da liriodenina ainda não foi esclarecido. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a liriodenina inibe a enzima topoisomerase II, que induz a quebra das duas fitas de DNA, reduzindo sua tensão torcional durante a replicação. A ação antifúngica da liriodenina pode ser similar à dos antibióticos que inibem essa enzima, levando à síntese defeituosa de RNA mensageiro e proteínas e, como consequência, à morte do microrganismo.⁵⁹

A liriodenina inibe a biosíntese de dopamina e o conteúdo de dopamina induzido pela L-DOPA em células PC12⁶⁰. Como a síntese de melanina, importante fator de virulência de espécies de *Cryptococcus*, também se dá a partir de L-DOPA, seria interessante investigar uma eventual atividade anti-melanogênica da liriodenina.

No entanto, estudo utilizando *Saccharomyces cerevisiae* sugeriu outro mecanismo de ação da liriodenina sobre leveduras. Esse estudo revelou que a liriodenina interrompe a síntese mitocondrial de ferro-enxofre, com base em três achados: por causar um desequilíbrio celular de ferro através da indução de genes importantes para a absorção e homeostase

celular; a demonstração, através de análise do genoma, de que as leveduras mutantes com deleção de genes responsáveis pela homeostase de ferro são hipersensíveis à liriodenina; por fim, o tratamento das leveduras com liriodenina levou a defeitos celulares similares à deficiência da síntese mitocondrial de ferro-enxofre, incluindo aumento dos níveis de ferro mitocondrial, diminuição da atividade das enzimas de enxofre e aumento do estresse oxidativo.⁶¹

Modelos bioquímicos para determinação do mecanismo de ação de compostos antifúngicos devem ser utilizados para avaliação da liriodenina.^{62,63}

Os estudos *in vitro* realizados com a liriodenina demonstraram sua atividade fungicida sobre leveduras e fungos termodimórficos, sugerindo que este composto deve ser avaliado em modelos de infecção animal, como parte do processo a ser seguido até chegar à avaliação de sua eficácia no tratamento de infecções humanas.

Referências Bibliográficas

1. Mendes RP, Cavalcante RS, Marques AS, Marques MEA, Venturini J, Sylvestre TF et al. Paracoccidioidomycosis: current perspectives from Brazil. *The Open Microbiol J.* 2017; 11: 224-282.
2. Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJA, Fernandes L, Paes HC, Hahn, RC et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol.* 2009; 52: 273–283.
3. Limper AH, Adenis A, Le T, Harrison TS. Fungal infections in HIV/AIDS. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(11):334-343.
4. Putot A, Perrin S, Jolivet A, Vantilcke V. HIV – associated disseminated histoplasmosis in western French Guiana, 2002-2012. *Mycoses.* 2015; 58(3):160-16.
5. Tang JL, Kung HC, Lei WC, Yao M, Wu UI, Hsu SC et al. High incidences of invasive fungal infections in acute myeloid leukemia patients receiving inductin chemotherapy without systemic antifungal prophylaxis: a prospective observational study in Taiwan. *PLoS One.* 2015;10(6):1-13.
6. Harrison N, Mitterbauer M, Tobudic S, Kalhs P, Rabitsch W, Greinix H et al. Incidence and characteristics of invasive fungal diseases in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: a retrospective cohort study. *BMC Infect Dis.* 2015; 15:584-592.
7. Spellberg B, Powers JH, Brass EP, et al. Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. *Clin Infect Dis.* 2004;38:1279–1286.
8. Walsh CT, Wencewicz TA. Prospects for new antibiotics: a molecule-centered perspective. *J Antibiot.* 2014;67:7–22.

9. Sharifi-Rad J, Salehi B, Varoni EM, Sharopov F, Yousaf Z, Ayatollahi SA et al. Plants of the *Melaleuca* Genus as Antimicrobial Agents: From Farm to Pharmacy. *Phytother Res* .2017; 31(10):1475-1494.
10. Ghaderi L, Moghimi R, Aliahmadi A, McClements DJ, Rafati H. Development of antimicrobial nanoemulsion-based delivery systems against selected pathogenic bacteria using a thymol-rich *Thymus daenensis* essential oil. *J Appl Microbiol*. 2017; 123(4):832-840.
11. Van Vuuren S, Holl D. Antimicrobial natural product research: A review from a South African perspective for the years 2009-2016. *J Ethnopharmacol*. 2017; 208:236-252.
12. Hufford CD, Funderburk MJ, Morgan JM, Robertson LW. Two antimicrobial alkaloids from heartwood of *Liriodendron tulipifera* L. *J Pharm Sci*. 1975; 64:789 – 792.
13. Hufford CD, Sharma AS, Oguntimein BO. Antibacterial and antifungal activity of lirioidenine and related oxoaporphine alkaloids. *J Pharm Sci*. 1980;69:1180–1183.
14. Graziöse R, Rathinasabapathy T, Lategan C, Poulev A, Smith PJ, Grace M et al. Antiplasmodial activity of aporphine alkaloids and sesquiterpene lactones from *Liriodendron tulipifera*. *J Ethnopharmacol*. 2011; 133(1):26-30.
15. Costa EV, da Cruz PE, de Lourenço CC, de Souza Moraes VR, de Lima Nogueira PC, Salvador MJ. Antioxidant and antimicrobial activities of aporphinoids and other alkaloids from the bark of *Annona salzmannii* A. DC. (Annonaceae). *Nat Prod Res*. 2013; 27: 1002-1006.
16. De La Cruz Chacón I, González-Esquinca AR, Lirioidenine alkaloid in *Annona diversifolia* during early development. *Natural Product Research*. 2011; 26: 42-49.
17. De La Cruz Chacón I, González-Esquinca AR, Feferb PG , Jiménez Garcia LFJ. Lirioidenine, early antimicrobial defence in *Annona diversifolia*. *Z. Naturforsch*. 2011; 66:

377-384.

18. Clark AM, Watson ES, Asfaq MK, Hufford CD. In vivo efficacy of antifungal oxoaporphine alkaloids in experimental disseminated candidiasis. *Pharm Res.* 1987;4(6):495-498.
19. de Paula e Silva ACA, Oliveira HC, Silva JF, Sangalli-Leite F, Scorzoni L et al. Microplate alamarBlue Assay for *Paracoccidioides* Susceptibility Testing. *Journal of Clinical Microbiology.* 2013; 51(4): 1250–1252.
20. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). DOCUMENT E.DEF 7.3.1 Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. 2017.
21. Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI), Document M38-A2. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi, Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI), Wayne, Pa, USA, 2nd edition, 2008.
22. Brilhante RSN, Fechine MAB, Cordeiro RA, Rocha MFG et al. *In vitro* effect of sulfamethoxazole-trimethoprim against *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(9):3978-3979.
23. Restrepo A, Jimenez BE. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined medium. *J Clin Microbiol* 1980; 12: 279-81.
24. Kauffman CA: Candiduria. *Clin Infect Dis.* 2005;41:371-376.
25. Saag MS, Cloud JR, Graybill et al. A comparison of itraconazole versus fluconazole as maintenance therapy for AIDS-associated cryptococcal meningitis. *Clin Infect Dis.* 1999;28:291-296.
26. Piscitelli SC, Gallicano KD. Interactions among drugs for HIV and opportunistic infections. *N Engl J Med.* 2001; 344(13):984–996.

27. Lee BE, Feinberg M, Abraham JJ, Murthy AR. Congenital malformations in a infant born to a woman treated with fluconazole. *Pediatric Infect Dis J.* 1992; 11:1062-1064.
28. Oz T, Guvenek A, Yildiz S, Karaboga E, Tamer YT, Mumcuyan N et al. Strength of selection pressure is an important parameter contributing to the complexity of antibiotic resistance evolution. *Molecular biology and evolution.* 2014; 31: 2387-2401
29. Gibbons S. Anti-staphylococcal plant natural products. *Nat Prod Rep.* 2004; 21(2):263-277.
30. Lima LAR, Johann S, Cisalpino PS, Pimenta LPP. *In vitro* antifungal activity of fatty acid methyl ester of the seeds of *Annona cornifolia* A.St.-Hil (Annonaceae) against pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev Soc Med Trop.* 2011; 44(6):777-780.
31. Lima LARS, Alves TMA, Zani CL, Sales Junior PA et al. *In vitro* cytotoxic, antifungal, trypanocidal and leishmanicidal activities of acetogenins isolated from *Annona cornifolia* A. St. -Hil. (Annonaceae). *Annals of the Brazilian Academy of Sciences.* 2014; 86(2):829-839.
32. San-Blas G, San-Blas F, Gil F, Apitz-Castro R. Inhibition of growth of the dimorphic fungus *paracoccidioides brasiliensis* by ajoene. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989; 33(9): 1641-1644.
33. Johann S, Cisalpino PS, Watanabe GA, Cota BB. Antifungal activity of extracts of some plants used in Brazilian traditional medicine against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Pharma Biol.* 2010; 48(4):388-396.
34. Gullo FP, Sardi JCO, Santos VAFFM, Sangalli-Leite F et al. Antifungal activity of maytenin and pristimerin. *J Evid Based Complementary Altern Med.* 2012; 1-16.
35. Alanís-Garza BA, González-González GM, Salazar-Aranda R, Waksman de Torres N, Rivas-Galindo VM. Screening of antifungal activity of plants from the northeast of Mexico. *J of Ethnopharmacology.* 2007; 114: 468–471.

36. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Ver.* 2007; 20: 133–163.
37. Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, et al. Epidemiology of candidemia in Latin-America: a laboratory-based survey. *PLoS One.* 2013; 8(3): e59374.
38. Kaiyar SK, Edlind TD. Identification and expression of multidrug resistance-related ABC transporter genes in *Candida krusei*. *Med Mycol.* 2001; 39: 109–116.
39. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* Species to Fluconazole and Voriconazole as Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion. *J OF Clin Microbiol.* 2010; 48(4): 1366–1377.
40. Padmaja V, Thankamany V, Hara N, Fujimoto Y, Hisham A. Biological activities of *Annona glabra*. *J Ethnopharmacol.* 1995;48(1):21-24.
41. Pinho FVS de A, da Cruz LC, Rodrigues NR, et al. Phytochemical Composition, Antifungal and Antioxidant Activity of *Duguetia furfuracea* A. St.-Hill. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7821051>.
42. Chastain DB, Henao-Martínez AF, Franco-Paredes C. Opportunistic Invasive Mycoses in AIDS: Cryptococcosis, Histoplasmosis, Coccidioidomycosis, and Talaromycosis. *Curr Infect Dis Rep.* 2017;19(10):36.
43. Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL. Clinical Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2010;50(3):291–322.
44. Kon, AS, Grumach AS, Colombo AL, Penalva ACO et al. Consenso em criptococose - 2008. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008; 41(5):524-544.

45. Armstrong-James D, Brown GD, Netea MG, Zelante T et al. Immunotherapeutic approaches to treatment of fungal disease. *Lancet Infect Dis.* 2017; 17:3044-5.
46. Jarvis JN, Meintjes G, Rebe K, Williams GN et al. Adjunctive interferon- γ immunotherapy for the treatment of HIV-associated cryptococcal meningitis: a randomized controlled trial. *AIDS.* 2012;26(9):1105-13.
47. Cardoso NNR, Alviano CS, Blank AF, Romanos MTV et al. Synergism Effect of the Essential Oil from *Ocimum basilicum* var. Maria Bonita and Its Major Components with Fluconazole and Its Influence on Ergosterol Biosynthesis. *Evidence - Based Complementary and Alternative Medicine.* 2016; (7-8):1-12.
48. Kontoyiannis DP, Marr KA, Park BJ et al. Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001-2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. *Clin Infect Dis.* 2010; 50: 1091-100.
49. Neofytos D, Fishman JA, Horn D *et al.* Epidemiology and outcome of invasive fungal infections in solid organ transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* 2010; 12: 220-9.
50. Patterson TF, Thompson GRI, Denning DW, Fishman JA et al. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2016;63(4):1-60.
51. Verweij PE, Lestrade PP, Melchers WJ, Meis JF. Azole resistance surveillance in *Aspergillus fumigatus*: beneficial or biased? *J Antimicrob Chemother.* 2016;71:2079-2082.
52. Nabili M, Shokohi T, Moazeni M *et al.* High prevalence of clinical and environmental triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* in Iran: is it a challenging issue? *J Med Microbiol.* 2016; 65: 468-475.
53. Verweij PE, Chowdhary A, Melchers WJ, Meis JF. Azole Resistance in *Aspergillus*

fumigatus: Can We Retain the Clinical Use of Mold-Active Antifungal Azoles? Clin Infect Dis. 2016; 62: 362-368.

54. Meis JF, Chowdhary A, Rhodes JL et al. Clinical implications of globally emerging azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2016; 371(1709):1-10.

55. Chowdhary A, Sharma C, Meis JF. Azole-resistant aspergillosis: Epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. J Infect Dis. 2017; 216:436-444.

56. Gonçalves SS, Souza ACR, Chowdhary A, Meis JF, Colombo AL. Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in *Candida* and *Aspergillus*. Mycoses. 2016;59:198-219.

57. Chowdhary A, Kathuria S, Xu J, Meis JF. Emergence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains due to agricultural azole use creates an increasing threat to human health. PLoS Pathog. 2013; 9(10): e1003633.

58. Snelders E, Huis In 't Veld RA, Rijs AJ, Kema GH, Melchers WJ, Verweij PE. Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. Appl Environ Microbiol. 2009; 75: 4053-4057.

59. Ho Woo S, Nan-Jun Sun NJ, Cassady JM, Snapka RM. Inhibition of Topoisomerase II by Liriodenine. Biochem Pharmacol. 1997; 54: 467-473.

60. Jin CM, Lee JJ, Yang YJ, Kim YM, Kim YK, Ryu SY et al. Liriodenine inhibits dopamine biosynthesis and L-DOPA-induced dopamine content in PC12 cells. Arch. Pharm. Res. 2007; 30(8):984-990.

61. Tripathi SK, Xu T, Feng Q, Avula B et al. Two Plant-Derived Aporphinoid Alkaloids Exert Their Antifungal Activity by Disrupting Mitochondrial Iron-Sulfur Cluster Biosynthesis. J. Biol. Chem. 2017. 292: 16578-16593.

62. Visbal G, San-Blas G, Murgich J, Franco H. *Paracoccidioides brasiliensis*, paracoccidioidomycosis, and antifungal antibiotics. *Current Drug Targets-Infectious Disorders*. 2005; 5: 211 – 226.
63. San-Blas G, San-Blas F. Immune and chemical responses to paracoccidioidomycosis. In: Jacobs PH, Nall L. *Fungal disease: biology, immunology and diagnosis*. Marcel Dekker, New York. 1997: 219 – 35.

Artigo II - Avaliação da absorção da liriodenina administrada por gavagem a camundongos da linhagem BALB/c. Estudo-piloto.

Adrielle Dandara Levorato¹, Ivan De La Cruz Chacón², Carmen Sílvia Fernandes Boaro³, Lariza Maza¹, Beatriz Aparecida Soares Pereira¹, Alexandre Todorovic Fabro⁴, Rinaldo Poncio Mendes¹.

¹ Departamento de Doenças Tropicais - Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Estado de São Paulo, Botucatu, Brasil; ² Instituto de Ciências Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Chiapas, México; ³ Departamento de Botânica - Instituto de Biociências de Botucatu - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Estado de São Paulo, Botucatu, Brasil; ⁴ Departamento de Patologia e Medicina Legal – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade do Estado de São Paulo (USP), Estado de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil.

Introdução

O uso de plantas com fins terapêuticos é uma das práticas mais antigas da humanidade, que ainda persiste, principalmente em populações de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Além disso, a emergência cada vez mais frequente de resistência microbiana contribui para o aumento dos estudos sobre a atividade antimicrobiana de plantas medicinais, em busca de novas alternativas de tratamento^{1,2,3}. De várias plantas são obtidos extratos, frações e óleos com atividade antimicrobiana sobre bactérias e fungos.^{4,5,6}

A liriodenina é um alcaloide do tipo oxoaporfínico (**Figura 1**) com atividade antibacteriana, antifúngica, antiprotozoária e citotóxica. Este componente tem sido isolado de plantas pertencentes a várias famílias botânicas.^{7,8,9,10, 11, 12}

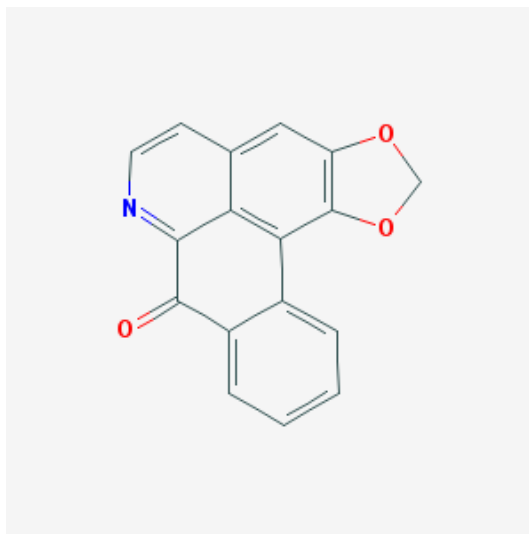


Figura 1. Estrutura química da liriodenina

A atividade antimicrobiana de determinada substância é inicialmente avaliada por testes *in vitro*. No entanto, a correlação entre atividade *in vitro* e eficácia do tratamento se encontra bem demonstrada para bactérias^{13,14}, mas nem sempre é observada para isolados fúngicos^{15,16}. A atividade *in vitro* da liriodenina foi avaliada para alguns fungos dimórficos, filamentosos e leveduras^{17,8,12}. A avaliação da atividade antifúngica em infecção experimental, em que o modelo murino ocupa lugar de destaque, depende da definição da via de administração do antifúngico e, como consequência, de sua absorção. Esta informação permitirá o desenvolvimento de estudos que tragam informações sobre as características farmacocinéticas e farmacodinâmicas do antifúngico em estudo.

A busca dessas informações revelou apenas dois estudos *in vitro*, que abordaram a ação da liriodenina sobre receptores muscarínicos¹⁸ e sobre a síntese de dopamina¹⁹ e um *in vivo*, que avaliou sua eficácia na candidíase murina disseminada, após administração intraperitoneal e intravenosa²⁰, mas nenhum que focalizasse sua farmacocinética ou pelo menos sua absorção após administração por gavagem.

Assim, o objetivo geral do presente estudo-piloto foi avaliar, em modelo murino, se a liriodenina era absorvida após administração por gavagem. Os objetivos específicos foram

observar o comportamento dos animais, após administração de duas diferentes doses de liriodenina e eventuais efeitos indesejáveis causados por esse alcaloide.

Material e Métodos

Animais

Foram utilizados quatro camundongos isogênicos albinos, da linhagem BALB/c, machos, com cinco a sete semanas de idade e peso médio de 25g, provenientes do biotério do Laboratório Experimental da Disciplina de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP. Os animais foram mantidos em caixas contendo em média dois animais, com cama de maravalha autoclavada, em ambiente a uma temperatura variando de 23 a 25°C, com luminosidade controlada por interruptor horário eletromecânico, isto é, 12h no claro e 12h no escuro, recebendo, “ad libitum”, água filtrada e ração comercial balanceada para camundongos, autoclavada.

Extração da liriodenina

As raízes de *Annona macrophyllata* Donn. Sm. foram coletadas em Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México e identificadas no Herbário Eizi Matuda da Universidade de Ciências e Arte de Chiapas com o número de coleção 352. As raízes foram secas em temperatura ambiente e moídas em moinho de faca. A extração de alcaloides foi realizada pelo método seletivo ácido-base. As amostras moídas foram umedecidas com solução saturada de Na₂CO₃ e deixadas para secar por 48 horas em temperatura ambiente. A extração dos alcaloides foi feita com clorofórmio (CHCl₃), sob constante agitação por duas horas e filtrados para obtenção da fase clorofórmica. Após esse período, ao extrato clorofórmico foi adicionado 1M HCl e a fase aquosa foi alcalinizada a pH 9,5 com solução de Na₂CO₃, seguindo-se nova extração com CHCl₃. Para obter o extrato total de alcaloides, o solvente foi rotaevaporado. Para a extração da liriodenina o extrato bruto de alcaloide foi filtrado em

sistema a vácuo em kitasato com papel filtro, obtendo-se massa seca. Para o experimento foram utilizadas 100 gramas de massa seca de raízes, com rendimento de 100 miligramas de liriodenina.¹⁰

Preparo e administração da liriodenina

A liriodenina foi dissolvida em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) a 4%. Para a preparação das doses de 0,75 e 1,50 mg.kg⁻¹, a 1,5 e 3,0 miligramas de liriodenina, respectivamente, foram adicionados 0,240 mL de DMSO 4%. A liriodenina foi administrada por gavagem, em dose única, às 12h00. Cada animal recebeu 0,120 mL da solução contendo liriodenina. As doses utilizadas foram definidas com base nos resultados do teste de sensibilidade *in vitro*.¹⁷

Grupos da pesquisa. Os animais foram divididos em dois grupos:

Grupo 1 (G1), constituído de dois camundongos sem infecção, que receberam liriodenina na dose de 0,75 mg.kg⁻¹, em uma única tomada;

Grupo 2 (G2), constituído de dois camundongos sem infecção, que receberam liriodenina na dose de 1,50 mg.kg⁻¹, também em uma única tomada.

Coleta de sangue dos camundongos

Após receberem dose única de liriodenina por gavagem às 12:00h, parte dos animais foi sacrificada às 18:00h e parte às 24:00h. Portanto, foi sacrificado um animal de cada grupo, em cada horário estabelecido. De cada animal, amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca, para determinação dos níveis séricos de liriodenina.

Sacrifício dos camundongos

Os camundongos sacrificados foram inicialmente anestesiados com 0,08 µL de uma solução com 24 µL de ketamina, 32 µL de xilasina e 24 µL de água destilada, administrada por via intraperitoneal, com o auxílio de uma seringa descartável milimetrada até 1,0 mL.

Após a sedação, o sangue foi coletado, por meio de punção cardíaca, com o auxílio de uma seringa de 1,0 mL e de uma agulha calibre 25 x 7. O sangue foi transferido para um tubo de ensaio estéril, sem anticoagulante e posteriormente centrifugado a 3.500 rpm, em centrífuga Revan Ciclo C I.

Dosagem sérica de liriodenina

As amostras de soros dos camundongos foram diluídas em 15 mL de água deionizada, a fim de aumentar o volume da solução de trabalho. Para extrair a gordura presente no soro, essa mistura foi colocada em funil de separação com 10 mL de hexano, sendo recolhida a fase aquosa, que posteriormente teve o pH ajustado para 9,5 com solução saturada de carbonato de sódio. Essa solução foi colocada em funil de separação com 10 mL de clorofórmio, sendo ao final recolhida a fase clorofórmica, que contém a liriodenina. Para identificação e quantificação da liriodenina, a amostra foi mantida em repouso até a completa evaporação do clorofórmio, posteriormente dissolvida em metanol e analisada em High Performance Liquid Chromatography (HPLC), segundo as especificações de De La Cruz Chacón & Gonzalez-Esquinca, 2011¹¹, modificada.¹²

As amostras foram eluídas em modo isocrático, 80% de Metanol (J.T.Baker, grau HPLC) e 20% de água ultrapura pH ajustado para 3,0 com ácido acético. A vazão da fase móvel foi de 1,0 mL/min e o tempo total de corrida foi igual a 15 minutos, com comprimento de onda 254 nm e volume de injeção de 20 µL. O compartimento do forno da coluna cromatográfica foi programado para 30°C. Foi utilizado o equipamento HPLC (Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000) equipado com detector UV-VIS, injetor automático com forno e bomba de quatro canais com desgasificador embutido e coluna LUNA® 5µm C18 (250 x 4,6 mm) marca Phenomenex.²¹

A dosagem do nível sérico de cada amostra foi feita em triplicata, utilizando-se a média das concentrações encontradas.

Avaliação histopatológica

O exame histopatológico dos intestinos foi realizado em todos os animais. Os intestinos foram coletados e fixados em formalina por 48 horas e, posteriormente, foram transferidos para álcool a 70% e incorporados em parafina. Foram realizados os cortes e, a seguir, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE).

Análise estatística dos resultados

Foi realizada a análise descritiva dos resultados devido ao pequeno número de animais avaliados neste estudo-piloto.

Comitê de Ética

Esse estudo-piloto, cujo protocolo é o de número 1249 / 2017 foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) no dia 26 de outubro de 2017 (**Anexo 2**).

Resultados

Observação clínica e exame histopatológico

Antes da administração da liriodenina, todos os animais se apresentavam calmos, com pêlos brilhantes e se alimentando de forma normal, condições que não se modificaram com a administração da liriodenina.

No entanto, 12 horas após a administração da liriodenina, os camundongos que receberam a dose de $1,50 \text{ mg.kg}^{-1}$ de peso corporal apresentavam distensão abdominal; a laparotomia revelou a presença de grande quantidade de gases intestinais (**Figura 2**). Esses achados não foram observados nos animais que receberam liriodenina na dose de $0,75 \text{ mg.kg}^{-1}$ de peso corporal.



Figura 2. Camundongos da linhagem BALB/c que receberam lirioidenina por gavagem, na concentração de $1,50 \text{ mg.kg}^{-1}$. O sacrifício foi realizado 12 horas após administração da lirioidenina. A1-B1- camundongos durante o sacrifício; A2-B2: intestinos retirados no momento do sacrifício.

Os exames histológicos dos cortes transversais dos intestinos de todos os animais, observados em microscopia luminosa, não evidenciaram alterações patológicas com nenhuma das doses empregadas e em nenhum dos dois diferentes momentos de sacrifício (Figura 3).

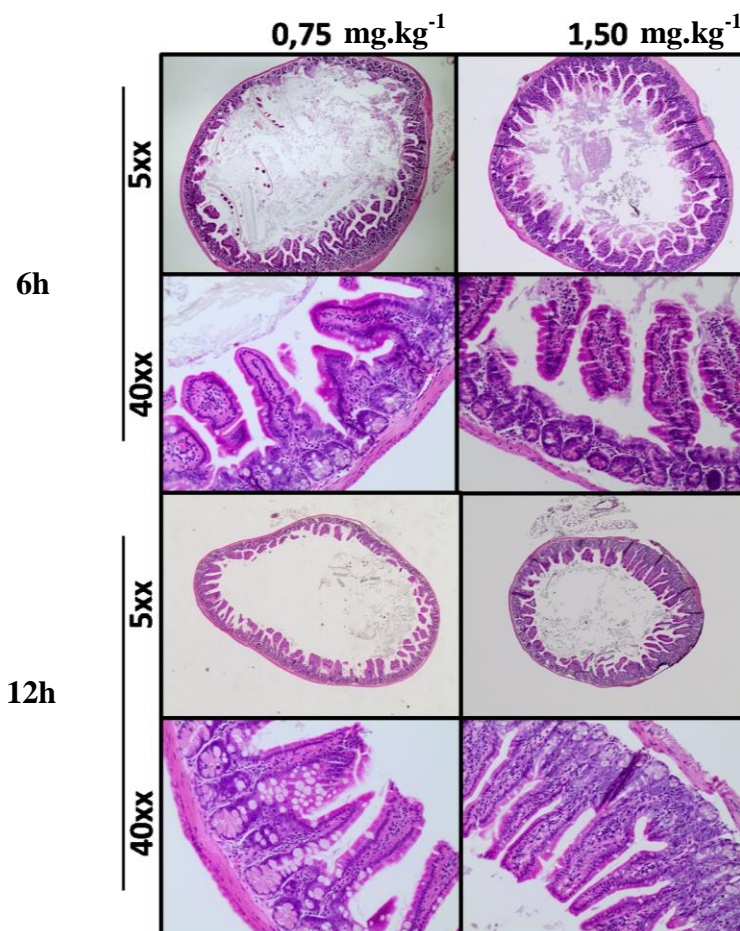


Figura 3. Perfil histomorfológico intestinal de camundongos BALB/c, após administração de liriodenina, por gavagem. Note a ausência de alterações patológicas em diferentes doses (0,75 e 1,50 mg.kg⁻¹) de liriodenina e diferentes momentos de sacrifício (6 e 12 horas da administração). HE; pequeno aumento (5xx).

Dosagem sérica de liriodenina

A liriodenina foi detectada tanto no soro de camundongos que receberam 0,75 mg.kg⁻¹ quanto naqueles em que 1,50 mg.kg⁻¹ de peso corporal foram administrados, confirmando a absorção dessa substância após administração por gavagem (**Figura 4**).

No entanto, os níveis séricos de lirioidenina revelaram comportamento diferente em função do tempo de administração, segundo a dose utilizada nos camundongos: os que receberam $0,75 \text{ mg.kg}^{-1}$ apresentaram aumento da concentração com o passar do tempo, enquanto achado oposto foi observado nos animais em que $1,50 \text{ mg.kg}^{-1}$ foram administrados.

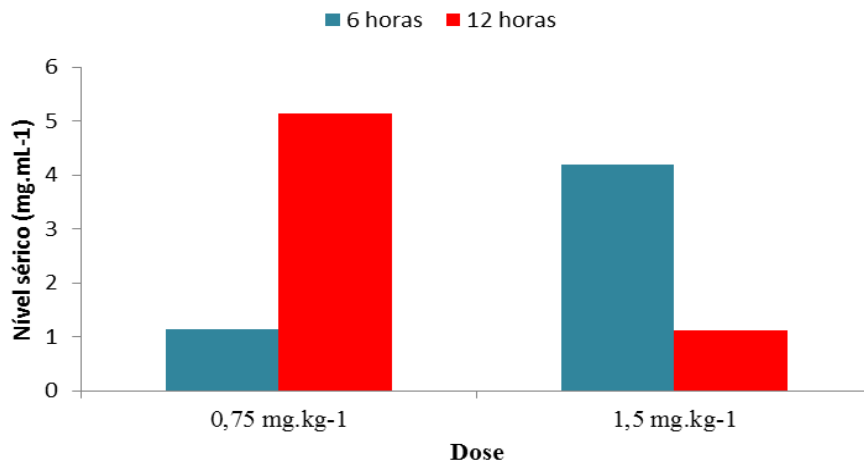


Figura 4. Níveis séricos de lirioidenina observados 6 e 12 horas após a administração de 0,75 e 1,50 mg.kg^{-1} de peso corporal, por gavagem. Dados de um animal por dose, em cada momento. O nível sérico é a média de três repetições, feitas em cada amostra. Estudo piloto.

Discussão

O estudo da via de administração de determinado fármaco constitui aspecto importante para sua utilização, pois a possibilidade de uso oral significa menores custos do tratamento, maior facilidade para sua aplicação e, como consequência, maior adesão do paciente.

A avaliação dos níveis séricos de liriodenina sugere melhor absorção com a menor dose utilizada, isto é $0,75 \text{ mg.kg}^{-1}$. Este achado talvez possa ser explicado por alterações funcionais determinadas pela dose de $1,50 \text{ mg.kg}^{-1}$, isto é, além da distensão abdominal por formação de gases, também a redução na absorção da liriodenina, pois a avaliação histopatológica, com coloração dos fragmentos pela hematoxilina-eosina, não revelou nenhuma lesão orgânica.

Portanto, este estudo-piloto atendeu ao objetivo geral, confirmando a absorção da liriodenina após administração por gavagem e a um objetivo específico, demonstrando que a dose mais elevada induziu prováveis alterações funcionais, caracterizadas por formação exagerada de gases e consequente distensão abdominal, além de diminuição da absorção intestinal dessa substância.

Como consequência desses achados, um delineamento para avaliação da farmacocinética e da farmacodinâmica da liriodenina se encontra em andamento, utilizando doses de até $0,75 \text{ mg.kg}^{-1}$ de peso corporal.

Referências bibliográficas

1. Fouladvand M, Barazesh A, Tahmasebi R. Evaluation of in vitro antileishmanial activity of curcumin and its derivatives. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013;17: 3306-3308.
- 2 Kim JM, Jung HA, Choi JS, Min BS, Lee NG. Comparative Analysis of the Anti-inflammatory Activity of Huang-lian Extracts in Lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 Murine Macrophage-like Cells Using Oligonucleotide Microarrays. *Arch Pharm Res.*2010; 33:149-1157.
3. Fabri RL, Nogueira MS, Moreira Jdos R, Bouzada ML, Scio E. Identification of antioxidant and antimicrobial compounds of *Lippia* species by bioautography. *J Med Food.* 2011; 14: 840-846.
4. Silva NC, Barbosa L, Seito LN, Fernandes A Jr. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of crude extracts and essential oils from medicinal plants. *Nat Prod Res.* 2012;26(16):1510-4.
5. Selim SA, Adam ME, Hassan SM, Alabalwi AR. Chemical composition, antimicrobial and antibiofilm activity of the essential oil and methanol extract of the Mediterranean cypress (*Cupressus sempervirens L.*). *BMC Complement Altern Med.* 2014; 14:179.
6. Mohammadi A, Nazari H, Imani S, Amrollahi H. Antifungal activities and chemical composition of some medicinal plants. *J Mycol Med.* 2014;24(2):e1-8.
7. Hufford CD, Funderburk MJ, Morgan JM, Robertson LW. Two antimicrobial alkaloids from heartwood of *Liriodendron tulipifera L.* *J Pharm Sci.* 1975; 64:789 – 792.
8. Hufford CD, Sharma AS, Oguntimein BO. Antibacterial and antifungal activity of liriodenine and related oxoaporphine alkaloids. *J Pharm Sci.* 1980;69:1180–1183.
9. Graziose R, Rathinasabapathy T, Lategan C, Poulev A, Smith PJ, Grace M et al.

Antiplasmodial activity of aporphine alkaloids and sesquiterpene lactones from *Liriodendron tulipifera*. *J Ethnopharmacol.* 2011; 133(1):26-30.

10. Costa EV, da Cruz PE, de Lourenço CC, de Souza Moraes VR, de Lima Nogueira PC, Salvador MJ. Antioxidant and antimicrobial activities of aporphinoids and other alkaloids from the bark of *Annona salzmannii* A. DC. (Annonaceae). *Nat Prod Res.* 2013; 27: 1002-1006.

11. de La Cruz Chacón I, González-Esquinca AR, Liriodenine alkaloid in *Annona diversifolia* during early development. *Nat Prod Res.* 2011; 26: 42-49.

12. de la Cruz Chacón I, González-Esquinca AR, Feferb PG, Jiménez Garcia LFJ. Liriodenine, Early Antimicrobial Defence in *Annona diversifolia*. *Z. Naturforsch.* 2011; 66: 377-384.

13. Mahajan G, Thomas B, Parab R, Patel ZE, Kuldharan S, Yemparala V et al. In vitro and in vivo activities of antibiotic PM181104. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 ;57(11):5315-9.

14. Villar R, Vicente E, Solano B, Pérez-Silanes S, Aldana I, Maddry JA et al. In vitro and in vivo antimycobacterial activities of ketone and amide derivatives of quinoxaline 1,4-di-N-oxide. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62(3):547-54.

15. Wong SS, Kao RY, Yuen KY, Wang Y, Yang D, Samaranayake LP et al. In vitro and in vivo activity of a novel antifungal small molecule against *Candida* infections. *PLoS One.* 2014;22;9(1):e85836.

16. Velez JD, Allendoerfer R, Luther M, Rinaldi MG, Graybill JR. Correlation of in vitro azole susceptibility with in vivo response in a murine model of cryptococcal meningitis. *J Infect Dis.* 1993;168(2):508-10.

17. Levorato AD, de la Cruz Chacón I, Ferreira G, dos Santos D, Moris DV, Marçon C.

Antifungal activity of liriodenine against fungi of the genus *Paracoccidioides* and other fungal species causing systemic mycoses. 2018. In press.

18. Lin CH, Chang GJ, Su MJ, Wu YC, Teng CM, Ko FN. Pharmacological characteristics of liriodenine, isolated from *Fissistigma glaucescens*, a novel muscarinic receptor antagonist in guinea-pigs. *Br J Pharmacol.* 1994; 113: 275-281.

19. Jin CM, Lee JJ, Yang YJ, Kim YM, Kim YK, Ryu SY et al. Liriodenine inhibits dopamine biosynthesis and L-DOPA-induced dopamine content in PC12 cells. *Arch. Pharm. Res.* 2007; 30(8):984-990.

20. Clark AM, Watson ES, Ashfaq MK, Hufford CD. In vivo efficacy of antifungal oxoaporphine alkaloids in experimental disseminated candidiasis. *Pharm Res.* 1987;4(6):495-8.

21. Lima Moreira DL, Leitão GG. Quantitative Determination of Liriodenine and Moupinamide in Five Species of *Mollinedia* by High Performance Liquid Chromatography. *Phytochem Anal.* 2001; 12:223–225.

III. Conclusões

III. CONCLUSÕES

Os achados deste presente estudo, nas condições em que foi desenvolvido, permitem tirar as conclusões que se seguem, apresentadas em função de cada artigo redigido.

Artigo 1. Atividade antifúngica da liriodenina sobre fungos do gênero *Paracoccidioides* e outros fungos causadores de micoses sistêmicas.

Estudos *in vitro* com liriodenina:

1. Em leveduras:

- A liriodenina apresenta atividade fungicida sobre espécies de *Candida* relevantes por sua frequência (*C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata*) e por sua resistência ao fluconazol (*C.krusei*) ou baixa sensibilidade ao fluconazol (*C.glabrata*).

- A liriodenina apresenta melhor atividade fungicida sobre cepas de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, agentes de micoses endêmicas e oportunistas, responsáveis por elevada morbidade e mortalidade em pacientes com a aids.

2. Em fungos termodimórficos:

- A atividade fungicida diferencial sobre cepas e isolados clínicos de fungos do gênero *Paracoccidioides* estimula futuros estudos sobre a eficácia desse composto nas distintas.

- As alterações celulares e citoplasmáticas em células de cepa padrão de *P.brasiliensis* (Pb18) tratadas com liriodenina levam à busca dos mecanismos de ação deste composto

3. Em fungos filamentosos:

- A liriodenina não apresentou atividade antifúngica sobre cepa de *Aspergillus fumigatus* (ATCC 7100) nas condições deste.

4. Na grande maioria das espécies a concentração fungicida mínima é semelhante à concentração inibitória mínima.

Artigo 2. Avaliação da absorção da liriodenina administrada por gavagem a camundongos da linhagem BALB/c. Estudo-piloto.

O estudo-piloto sobre a avaliação da absorção da liriodenina administrada por gavagem a camundongos da linhagem BALB/c, permitiu concluir o que se segue:

- A liriodenina pode ser administrada por gavagem, com vantagem da facilidade de administração, em dose de $0,75 \text{ mg.kg}^{-1}$ que apresentou melhor absorção e com ausência de efeitos indesejáveis e alterações histológicas nos intestinos.

IV. Anexos

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Atividade da liriodenina extraída de *Annona macrophyllata* sobre isolados do gênero *Paracoccidioides*.

Pesquisador: Adriele Dandara Levorato

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 72539317.4.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.257.787

Apresentação do Projeto:

As limitações frequentes dos antifúngicos e o aumento na incidência das infecções fúngicas sistêmicas têm ressaltado a necessidade de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar in vitro e in vivo a atividade da liriodenina extraída da planta *Annona macrophyllata* sobre isolados do gênero *Paracoccidioides*, bem como possíveis alterações morfológicas induzidas pela liriodenina na concentração inibitória mínima.

Esta pesquisa será constituída de dois experimentos. No primeiro, serão realizados os testes de sensibilidade in vitro com liriodenina sob isolados fúngicos. O teste de sensibilidade in vitro será conduzido com 10 diferentes concentrações de liriodenina (500 a 0,97 g.mL⁻¹). Considerando concentração que se revelar ativa no experimento I, será realizado o segundo experimento, o teste in vivo, utilizando-se a infecção experimental por *Paracoccidioides brasiliensis* em modelo com *Galleria mellonella*.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário: Avaliar a atividade antifúngica de liriodenina extraída de *Annona macrophyllata* contra fungos do gênero *Paracoccidioides*.

Objetivos Secundários:

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

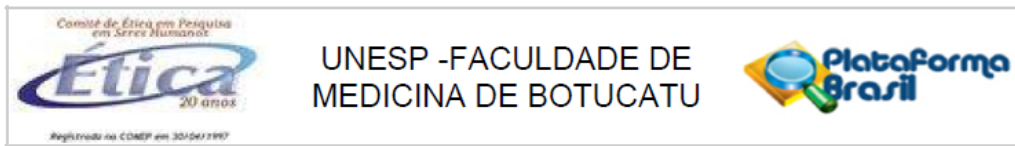
UF: SP

Telefone: (14)3880-1609

CEP: 18.618-970

Município: BOTUCATU

E-mail: kleber@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.257.787

Os autores propõem a dispensa do TCLE, uma vez que a coleta de material para isolamento de *Paracoccidioides brasiliensis* foi feita anteriormente em função de indicação clínica e a conduta indicada já foi tomada. Os demais isolados avaliados serão amostras padrões (ATCCs). Considera-se a justificativa pertinente.

O projeto está orçado em R\$ 5.460,00 e conta com financiamento próprio.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os seguintes documentos de caráter obrigatório:

- Folha de rosto devidamente assinada;
- Termo de Anuência Institucional (EAP);
- Projeto de Pesquisa;
- Regulamento de funcionamento de Biorrepositório.

Os autores pedem dispensa do TCLE, sob justificativa de que a coleta de material para isolamento de *Paracoccidioides brasiliensis* foi feita anteriormente em função de indicação clínica e a conduta indicada já foi tomada. O material encontra-se armazenado no Laboratório de Micologia Médica – Unidade de Pesquisa Experimental, da FMB – UNESP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sugere-se a aprovação do presente projeto de pesquisa sem necessidade de envio à CONEP.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto de Pesquisa APROVADO, deliberado em reunião ORDINÁRIA do CEP de 04/09/2017, sem necessidade de envio à CONEP.

O CEP solicita aos pesquisadores que após a execução do projeto em questão, seja enviado o Relatório Final de Atividades, o qual deverá ser enviado via Plataforma Brasil na forma de "NOTIFICAÇÃO".

LEMBRAMOS QUE A PRESENTE PESQUISA SOMENTE PODERÁ SER INICIADA APÓS DIA 04/09/2017 – DATA DA APROVAÇÃO DO CEP.

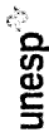


Comissão de Ética no Uso de Animais

Cidade através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA



CERTIFICADO Nº 1249/2017-CEUA

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da absorção da liriodenina administrada por gavagem a camundongos da linhagem BALB/c", conduzida pela Pesquisadora: Adrielle Dandara Levorato, Orientada pelo Prof. Dr. Rinaldo Poncio Mendes, com a participação da Colaboradora: Lariza Maza, registrada com o nº 1249/2017, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião de 26 de outubro de 2017.

Finalidade	() Ensino - (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	26/12/2017
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongo isogênico – BALB/c
Nº de animais	16
Peso/Idade	25 gramas – 7 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério Experimental do Laboratório de Doenças Tropicais – FMB/UNESP

Prof. Dr. Guilherme Antônio Moreira de Barros
Presidente

Graziela Nogueira Bertani
Secretária

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P. CEP: 18.618-970 Fone: (14) 3880-1601/ 3880-1608/3880-1609 e-mail secretária: ceua@fmb.unesp.br