



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

ANDRESSA MARIA AGUIAR DE CARVALHO

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *in vitro* DOS ALCALOIDES DAS FOLHAS DE
Pilocarpus microphyllus ISOLADOS E EM COMBINAÇÃO COM FÁRMACOS
ANTIFÚNGICOS**

**PARNAÍBA – PI
MAIO – 2018**

ANDRESSA MARIA AGUIAR DE CARVALHO

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *in vitro* DOS ALCALOIDES DAS FOLHAS DE
Pilocarpus microphyllus ISOLADOS E EM COMBINAÇÃO COM FÁRMACOS
ANTIFÚNGICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Área de concentração: Marcadores epidemiológicos em saúde

Orientador (a): Profa. Dra. Tatiane Caroline Daboit

PARNAÍBA – PI
MAIO - 2018

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – *Campus Parnaíba*
Serviço de Processamento Técnico

C331a Carvalho, Andressa Maria Aguiar de.

Atividade antifúngica *in vitro* dos alcaloides das folhas de *Pilocarpus microphyllus* isolados e em combinação com fármacos antifúngicos [manuscrito] / Andressa Maria Aguiar de Carvalho. – 2018.

126 f. : il.

Impresso por computador (printout).

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Federal do Piauí, 2018.

Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Tatiane Caroline Daboit.

ANDRESSA MARIA AGUIAR DE CARVALHO

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *in vitro* DOS ALCALOIDES DAS FOLHAS DE
Pilocarpus microphyllus ISOLADOS E EM COMBINAÇÃO COM FÁRMACOS
ANTIFÚNGICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

APROVADA EM 25/05/18

BANCA EXAMINADORA:

Tatiane Caroline Daboit

Dra. Tatiane Caroline Daboit / Universidade Federal do Piauí

(Orientadora)

Leiz Maria Costa Veras

Dra. Leiz Maria Costa Veras / Universidade Federal do Piauí

(Membro 1)

Anna Carolina Toledo Da Cunha Pereira

Dra. Anna Carolina Toledo Da Cunha Pereira / Universidade Federal do Piauí

(Membro 2)

PARNAÍBA – PI

MAIO-2018

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê” (Arthur Schopenhauer)

Dedico este trabalho a minha família pelo apoio e amor incondicionais, e à vida pelas oportunidades que me concede

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre guiar meus caminhos. Aos meus pais, Amauri Pinto de Carvalho e Josineide Aguiar de Carvalho pelo apoio consentido, por acreditarem nos meus sonhos e se orgulharem das minhas conquistas. Aos meus tios, Josilene Aguiar Fernandes e Antônio Fernandes, e primos Leticia Aguiar Fernandes, Joyce Aguiar Fernandes e Nycolas Aguiar Fernandes pelo acolhimento.

Aos meus irmãos, Vanessa Carvalho e Mateus Carvalho, por todo o carinho, amor e companheirismo em todos os momentos. Ao Conor Hall, por todo amor, compreensão e por sempre acreditar no meu potencial.

À minha orientadora Prof. Dra. Tatiane Caroline Daboit, por todos os ensinamentos, paciência e por me confiar a realização desse projeto. Obrigada por todas as oportunidades, incentivo e amizade que me concede desde a graduação.

À Prof. Dra. Leiz Maria Costa Veras, à Anidro do Brasil Extrações S.A e à Phytobios Pesquisa Desenvolvimento e Inovação LTDA, empresas do Grupo Centroflora pela doação dos alcaloides do jaborandi. Sem eles, este projeto não poderia ter sido desenvolvido.

Ao Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, BIOTEC, *Campus* Ministro Reis Velloso, Universidade Federal do Piauí, pela parceria e apoio técnico. Em especial, agradeço à técnica MSc. Alyne Rodrigues de Araújo pela amizade e auxílio nas análises realizadas.

Aos colegas membros do Grupo de Estudos Avançados em Micologia Médica, GEAMICOL, *Campus* Ministro Reis Velloso, Universidade Federal do Piauí, pelo auxílio na parte laboratorial, companheirismo, amizade e por estarem sempre torcendo pelo meu sucesso. Em especial, à colega e amiga de pós-graduação, Maria Gabriela Araújo e à aluna de iniciação científica e amiga, Renata Nolêto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI), pela concessão da verba para financiamento desse projeto - Edital FAPEPI/SESAPI/MS/CNPq n°002/2016 - PPSUS- projeto EFP 00012092.

À UFPI e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas pela oportunidade de aprendizado.

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	12
LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS	14
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
1. INTRODUÇÃO.....	18
2.CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA	
2.1. Infecções fúngicas.....	22
2.2. Ceratite fúngica filamentosa	
2.2.1. Ceratite: Aspectos gerais	24
2.2.2. Etiologia.....	24
2.2.3. Habitat e epidemiologia	26
2.2.4. Patogenia	28
2.2.5. Aspectos clínicos e laboratoriais	30
2.2.6. Tratamento.....	31
2.3 Cromoblastomicose	
2.3.1. Aspectos gerais.....	33
2.3.2. Etiologia.....	35
2.3.3. Habitat e epidemiologia	37
2.3.4. Patogenia	38
2.3.5. Aspectos clínicos e laboratoriais	39
2.3.6. Tratamento	42
2.4. Teste de avaliação da atividade antifúngica	45

2.5. Combinação de fármacos	46
2.6. <i>Pilocarpus microphyllus</i>	
2.6.1. Alcaloides do jaborandi: generalidades	48
2.6.2. Pilocarpina	50
2.6.3. Epiisopiloturina	51
2.7. Referências	53
2.8. Objetivos	68
 3. CAPÍTULO 2 – PROSPECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ALCALOIDES DAS FOLHAS DO JABORANDI E O EFEITO SINÉRGICO DA ASSOCIAÇÃO DA TERBINAFINA COM O CLORIDRATO DE PILOCARPINA	
Resumo	70
3.1. Introdução	71
3.2. Materiais e métodos	72
3.3. Resultados.....	75
3.4. Discussão	75
3.5. Conclusão	80
3.6. Referências	81
 4. CAPÍTULO 3 – PERFIL DA ASSOCIAÇÃO DE CLORIDRATO DE PILOCARPINA COM TERBINAFINA CONTRA AGENTES DA CERATITE FÚNGICA FILAMENTOSA.	
Resumo	86
4.1. Introdução	87
4.2. Materiais e métodos	88
4.3. Resultados.....	90
4.4. Discussão	90
4.5. Conclusão	93
4.6. Referências	93

5. CAPÍTULO 4 - AVALIAÇÃO DO PERFIL DE INTERAÇÃO *in vitro* DA
EPIISOPILOTURINA COM ANTIFÚNGICOS CONTRA AGENTES DA
CROMOBLASTOMICOS

Resumo	99
5.1. Introdução	100
5.2. Materiais e métodos	102
5.3. Resultados.....	104
5.4. Discussão	118
5.5. Conclusão	118
5.6.Referências	118
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	124
7. PERSPECTIVAS	125

RESUMO

As infecções fúngicas têm papel importante na morbimortalidade humana. Apesar disso, pesquisas que visam o desenvolvimento de terapias ou fármacos mais seguros e efetivos ainda estão defasadas quando comparadas com as doenças causadas por outros patógenos. Dentre as infecções causadas por fungos podem-se citar a cromoblastomicose e a ceratite fúngica filamentosa. A primeira é uma doença polimorfa que ocorre, pela implantação traumática transcutânea de fungos dematiáceos. A última é uma infecção ocular em que ocorre ulceração supurativa da córnea e que pode levar à cegueira. Ambas doenças apresentam número crescente de casos refratários aos tratamentos utilizados. Deste modo, se faz necessária a busca por novas moléculas, bem como a otimização da farmacoterapia atual. Os vegetais são fontes importantes e promissoras de novos fármacos. A espécie *Pilocarpus microphyllus*, popularmente conhecida como 'jaborandi', é uma planta nativa das regiões Norte e Nordeste do Brasil. Vários alcaloides foram isolados das folhas dessa planta, dentre eles, a pilocarpina e a epiisopiloturina, as quais apresentam atividades farmacológicas descritas na literatura. Porém, carecem de análise no que se refere à atividade antifúngica. Esse trabalho objetivou avaliar a susceptibilidade fúngica aos alcaloides obtidos a partir das folhas do jaborandi, através de ensaios *in vitro*, bem como verificar o efeito da interação desses compostos com agentes antifúngicos. Inicialmente, foi realizada uma prospecção de atividade antifúngica com os alcaloides pilocarpina, isopilocarpina, epiisopilosina, isopilosina e pilosina contra fungos patogênicos (n = 10), incluindo representantes de dermatófitos, agentes da cromoblastomicose e da esporotricose, bem como isolados dos gêneros *Aspergillus*, *Candida* e *Cryptococcus*. A partir destes resultados, o cloridrato de pilocarpina foi selecionado para que fosse avaliado seu efeito em combinação com a terbinafina contra estes mesmos representantes fúngicos e contra agentes da ceratite fúngica filamentosa (n = 8). A epiisopiloturina foi também avaliada quanto à atividade antifúngica, bem como a sua associação com quatro fármacos antifúngicos (itraconazol, posaconazol, terbinafina e anfotericina B) frente a agentes da cromoblastomicose (n = 19). Os testes de susceptibilidade foram realizados de acordo com os métodos de microdiluição propostos nos protocolos M27-A3 e M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute*. As interações dos alcaloides com os fármacos antifúngicos foram realizadas usando o método de tabuleiro de xadrez. Para análise do efeito das alterações morfológicas causadas pela combinação de epiisopiloturina/anfotericina B em *Fonsecaea pedrosoi* ATCC 46428, foram obtidas imagens utilizando microscopia de força atômica. Dos alcaloides testados, o cloridrato de pilocarpina e a pilosina apresentaram atividade antifúngica para *Fonsecaea pedrosoi* e *Trichophyton rubrum*, respectivamente (CIM = 256 µg/mL). A interação da pilocarpina com a terbinafina se mostrou sinérgica (IFCI = 0,03 – 0,5) para todos os fungos testados. Essa mesma associação se mostrou sinérgica para cinco, dos oito isolados de agentes da ceratite fúngica filamentosa avaliados. A epiisopiloturina, não apresentou atividade antifúngica (CIM > 256 µg/mL) contra os agentes da cromoblastomicose. No entanto, as associações da mesma com a terbinafina ou com a anfotericina B foram sinérgicas contra estes últimos. Nenhuma das combinações realizadas teve efeito antagônico. A análise das imagens obtidas por microscopia de força atômica mostrou que as hifas de *Fonsecaea pedrosoi* ATCC 46428 foram completamente destruídas pela associação de epiisopiloturina com a anfotericina B. Os resultados obtidos com os testes de susceptibilidade e análise das combinações nos permitem sugerir um mecanismo de ação para a epiisopiloturina, onde a mesma agiria intracelularmente, dependendo da desestruturação da membrana plasmática para poder atuar. Este trabalho traz resultados promissores para a terapia antifúngica, especialmente para o tratamento da cromoblastomicose e da ceratite fúngica filamentosa, em que a combinação dos alcaloides cloridrato de pilocarpina e epiisopiloturina com agentes antifúngicos poderia reduzir o aparecimento da resistência ao passo que diminuiria a toxicidade causada por estes últimos.

Palavras-chave: Ceratite Fúngica, Cromoblastomicose, *Fonsecaea pedrosoi*, Epiisopiloturina, Pilocarpina, Sinergismo.

ABSTRACT

Fungal infections play an important role in human morbidity and mortality. Despite this, researches aimed at finding therapies or drugs that are more effective and safer still lagged in comparison with diseases caused by other pathogens. Among the infections caused by fungi, can be mentioned chromoblastomycosis and filamentous fungal keratitis. The first is a polymorphic disease that occurs due to traumatic implantation of dematiaceous fungi. The latter is an ocular infection where suppurative corneal ulceration occurs and can lead to blindness. Both diseases present an increasing number of refractory cases to the treatments. In this way, the search for new molecules is needed, as well as optimization of current pharmacotherapy. Plants are important and promising source of new drugs. The species *Pilocarpus microphyllus*, popularly known as 'jaborandi', is a native plant of North and Northeast regions of Brazil. Several alkaloids were isolated from this plant, among them, pilocarpine and epiisopiloturine. These, present some pharmacological activities already described in the literature. Yet, they lack in analysis regarding its antifungal activity. This study aimed to evaluate the fungal susceptibility to alkaloids obtained from 'jaborandi' leaves, using *in vitro* assays, along with their interaction with antifungal agents. Initially, a prospection of antifungal activity was carried out with the alkaloids pilocarpine, isopilocarpine, epiisopilosine, isopilosine e pilosine against pathogenic fungi (n = 10), including representatives of dermatophytes, chromoblastomycosis and sporotrichosis agents, as well as isolates of the genera *Aspergillus*, *Candida* and *Cryptococcus*. From these results, pilocarpine was selected to evaluate its effect in association with terbinafine against the same fungal isolates and against isolates agents of filamentous fungal keratitis (n = 8). Epiisopiloturine was analysed for its profile of antifungal activity, as well as its interaction with four antifungal drugs (itraconazole, posaconazole, terbinafine and amphotericin B) against chromoblastomycosis agents (n = 19). Susceptibility tests were conducted according to the microdilution techniques proposed in the protocols M27-A3 and M38-A2 by *Clinical and Laboratory Standards Institute*. The interaction of the alkaloids with antifungal drugs were carried out using the chessboard technique. Morphologic alterations caused by epiisopiloturine/amphotericin B combination on *Fonsecaea pedrosoi* ATCC 46428, were analysed through atomic force microscopy images. Of the alkaloids tested, pilocarpine hydrochloride and pilosine showed antifungal activity for *Fonsecaea pedrosoi* and *Trichophyton rubrum*, respectively (MIC = 256 µg/mL). The association of pilocarpine with terbinafine was synergic (FICI = 0,03 – 0,5) for all the tested isolates. The same association showed synergic activity for five, among of the eight isolates of filamentous fungal keratitis tested. Epiisopiloturine, did not present fungal activity (MIC > 256 µg/mL) against chromoblastomycosis agents. Its association with terbinafine, amphotericin B, however, was synergic for the latter. None of the combinations analysed showed antagonism effect. Images analyses obtained by atomic force microscopy exhibit hyphae completely destroyed by the association of epiisopiloturine/amphotericin B. The results obtained with the susceptibility tests and analyses of the combinations allowed us to suggest an action mechanism for epiisopiloturine, where it would act intracellularly, depending on the plasmatic membrane disruption to be able to act. This study brings promising results for antifungal therapy, especially for treatment of chromoblastomycosis and filamentous fungal keratitis, in which the combination of the alkaloids pilocarpine and epiisopiloturine could reduce the emergence of resistance while decreasing the toxicity presented by current treatments.

Keywords: Chromoblastomycosis, Epiisopiloturine, *Fonsecaea pedrosoi*, Fungal Keratitis, Pilocarpine, Synergism

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

AmB	Anfotericina B
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
IFCI	Índice Fracionário da Concentração Inibitória
MFA	Microscopia de Força Atômica
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfônico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
RS	Rugosidade de Superfície
UFCs	Unidades Formadoras de Colônias

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 2.1. Aspectos macroscópicos e microscópicos do gênero <i>Fusarium</i>	25
FIGURA 2.2. Aspectos macroscópicos e microscópicos do gênero <i>Aspergillus</i>	26
FIGURA 2.3. Diferentes partes da córnea afetada pelos fungos na ceratite filamentosa fúngica.....	30
FIGURA 2.4. Aspectos clínicos na ceratite filamentosa fúngica	31
FIGURA 2.5. Aspectos macroscópicos de colônias da cromoblastomicose	36
FIGURA 2.6. Distinção morfológica dos gêneros da família Herpotrichiellacea	36
FIGURA 2.7. Lesões da cromoblastomicose com diferentes graus de severidade	40
FIGURA 2.8. Aspectos clínicos das lesões da cromoblastomicose	41
FIGURA 2.9. Células muriformes visualizadas em exame micológico	42
FIGURA 2.10. Exemplar de <i>Pilocarpus microphyllus</i>	49
FIGURA 2.11. Estrutura química da pilocarpina.....	51
FIGURA 2.12. Estrutura química da epiisopiloturina	52

CAPÍTULO 4

FIGURA 5.1. Imagens de microscopia de força atômica de <i>Fonsecaea pedrosoi</i> ATCC 46428 tratado com a epiisopiloturina e a anfotericina B isoladas e em combinação	110
FIGURA 5.2. Perfil correspondente das células de <i>Fonsecaea pedrosoi</i> ATCC 46428 a partir da microscopia de força atômica.....	111

FIGURA 5.3. Valores da rugosidade média das células de *Fonsecaea pedrosoi* ATCC 46428 quando tratadas com epiisopiloturina (EPII) e com anfotericina B112

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

TABELA 3.1 Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) obtidas para os alcaloides do <i>Pilocarpus microphyllus</i> e itraconazol (ITRA) contra isolados fúngicos	76
TABELA 3.2. Atividade antifúngica da pilocarpina (PILO) e terbinafina (TERB) sozinhas ou em combinação contra isolados fúngicos	77

CAPÍTULO 3

TABELA 4.1. Atividade antifúngica do cloridrato de pilocarpina (PILO) e terbinafina (TERB) isoladamente e em associação contra agentes da ceratite fúngica filamentosa.....	91
---	----

CAPÍTULO 4

TABELA 5.1. Atividade <i>in vitro</i> da combinação antifúngica da epiisopiloturina (EPI) com itraconazol (ITRA) contra agentes da cromoblastomicose.....	106
TABELA 5.2. Atividade <i>in vitro</i> da combinação antifúngica da epiisopiloturina (EPI) com posaconazol (POSA) contra agentes da cromoblastomicose	107
TABELA 5.3. Atividade <i>in vitro</i> da combinação antifúngica da epiisopiloturina (EPI) com terbinafina (TERB) contra agentes da cromoblastomicose	108
TABELA 5.4. Atividade <i>in vitro</i> da combinação antifúngica da epiisopiloturina (EPI) com anfotericina B (AmB) contra agentes da cromoblastomicose.....	109
TABELA 5.5. Estatística descritiva dos valores de rugosidade.....	112

1. INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas constituem uma ameaça para a crescente população de imunocomprometidos, bem como para indivíduos situados em áreas endêmicas. Essas doenças vêm aumentando sua incidência em décadas recentes e têm se tornado um problema grave de saúde pública (CHEN et al., 2014; GARBEE, PIERCE e MANNING, 2017; FUENTEFRIA et al., 2017). Essa problemática se torna ainda maior quando se trata de infecções que ocorrem em países tropicais (HAY, 2008; ABDULLA e SAEED, 2015). O agravamento dessas infecções nessas áreas se dá pela própria característica dos fungos, que se desenvolvem melhor em clima tropical, assim como pelo fato de tais doenças serem geralmente negligenciadas (QUEIROZ-TELLES et al., 2017a). Dentre estas, destacamos a cromoblastomicose e a ceratite fúngica filamentosa.

Apesar de ser uma infecção global, a ceratite fúngica filamentosa preenche todos os critérios para ser considerada uma doença tropical negligenciada (QUEIROZ-TELLES et al., 2017a). Essa, é uma condição onde a córnea é infectada, causando uma ulceração supurativa, que pode levar à cegueira (THOMAS e KALIAMURTHY, 2013; HE et al., 2016). Independente do fármaco de escolha, o sucesso da terapia requer uso prolongando dos mesmos, uma vez que estes tendem a ter uma baixa biodisponibilidade na córnea. Esses fatores aliados à emergência de isolados resistentes aos fármacos, juntamente com a recorrência das infecções enfatizam a necessidade de uma modalidade terapêutica mais eficiente (BOUCIER et al., 2017; AUSTIN, LIETMAN e ROSE-NUSSBAUMER, 2017).

Em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) incluiu a cromoblastomicose na lista de doenças tropicais negligenciadas. Esta é uma infecção fúngica da pele e do tecido subcutâneo, causada pela implantação de fungos dematiáceos (DABOIT et al., 2012; PORTO 2016; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b; WHO, 2017). Não há uma terapia considerada ‘padrão ouro’ para essa micose, uma vez que os fármacos empregados requerem longos períodos de utilização, com doses elevadas e baixas taxas de cura. O tratamento prolongado eleva o custo e a toxicidade (MARTINEZ e TOVAR, 2007; DABOIT, 2013; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b).

Compostos naturais oriundos de plantas vêm sendo fonte de pesquisas nos últimos anos, pela ampla gama de estruturas químicas e de atividades biológicas (KAYSER, KIDERLEN e CROF 2003; VERAS et al., 2012; MURTAZA, MUKHTAR e SARFRAZ, 2015; ROY, 2017a). Uma das plantas de destaque no Brasil, o “Jaborandi” (*Pilocarpus microphyllus*), tem atraído a atenção pelas atividades biológicas dos seus alcaloides. Essa planta possui vasta ocorrência na região meio-norte (Estados do Maranhão e Piauí) (LIMA, 2016). Dentre os alcaloides extraídos do jaborandi destacam-se a pilocarpina e a epiisopiloturina (CASTRO, 2007; MORAES, 2015).

O primeiro é um fármaco utilizado para o tratamento do glaucoma. O segundo é o composto mais abundante da biomassa gerada na extração da pilocarpina, cujas atividades biológicas têm sido reportadas (LEWIS e ELVIN-LEWIS, 1977; SANTOS e MORENO, 2004; VERAS et al., 2013; LIMA et al., 2015; MELO et al., 2015). Estes alcaloides apresentam poucos relatos de atividade antifúngica e apenas um estudo avaliou a interação da pilocarpina com anfotericina B (RHODUS et al., 1998; ARAUNA, et al., 2012; CARVALHO et al., 2018). Nenhum trabalho relatou qualquer estudo de interação da epiisopiloturina com fármacos antifúngicos. Além da pilocarpina e da epiisopiloturina, o jaborandi gera outros alcaloides, isômeros dos dois primeiros (SANTOS e MORENO, 2013). Estes, até o momento, não apresentam qualquer relato quanto à atividade antifúngica.

A cromoblastomicose e a ceratite filamentosa fúngica são micoses características de populações tropicais, afetando muita das vezes indivíduos de baixa renda envolvidos com a labutação. Um estudo revelou que a incidência da ceratite fúngica no Brasil é maior nos meses de seca, em homens com atividade agrícola, sugerindo que a doença está relacionada à atividade agrícola extensiva, que ocorre com frequência na região Nordeste do Brasil (XIMENES, VASCONCELOS e MONTE, 2016). Os fungos negros, causadores da cromoblastomicose, foram isolados de fragmentos do coco do babaçu. O Estado do Piauí possui o ecossistema de mata de babaçu que abrange 35 municípios (CASTRO, 2007; MORAES, 2015). Isso faz dos trabalhadores que estão envolvidos com tais atividades, indivíduos vulneráveis em adquirir esta infecção.

Sabendo que essas populações permanecem em risco contínuo de infecção, tem-se a necessidade de um fármaco ou terapia que apresente uma alta eficácia, com redução dos efeitos colaterais e da resistência. Nesse contexto, o uso dos alcaloides do jaborandi, isoladamente, ou em combinação com fármacos costumeiramente utilizados, poderia ser uma alternativa para a terapia dessas e de outras infecções fúngicas.

O trabalho é composto de quatro capítulos: O primeiro trata de uma revisão de literatura sobre doenças fúngicas, com destaque para a ceratite fúngica filamentosa e a cromoblastomicose, seguida de uma breve explanação sobre os testes de susceptibilidade, bem como sobre o jaborandi e seus alcaloides. Os três capítulos seguintes foram organizados na forma de artigos científicos, intitulados: “Prospecção da atividade antifúngica dos alcaloides das folhas do jaborandi e o efeito sinérgico da associação da terbinafina com o cloridrato de pilocarpina”, “Perfil da associação de cloridrato de pilocarpina com terbinafina contra agentes da ceratite fúngica filamentosa” e “Avaliação do perfil de interação *in vitro* da epiisopiloturina com antifúngicos contra agentes da cromoblastomicose”. Estes foram formatados segundo as

normas da ABNT NBR 6023, NBR 6024, NBR 10520 e NBR 14724, para serem submetidas, a periódicos indexados nos Qualis “B-2”, Qualis “B-1” e Qualis “A-2” da CAPES, respectivamente.

CAPÍTULO 1

Revisão de Literatura

2. CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecções fúngicas

Das mais de 2 milhões de espécies de fungos na terra, apenas 600 são causadoras de doenças. Os fungos patogênicos têm enorme influência na vida de plantas e animais. Um relatório detalhou o impacto desses agentes sobre espécies em extinção, segurança alimentar e em distúrbios no ecossistema (FISHER et al., 2012). Em contraste, o efeito das infecções fúngicas na saúde humana não é amplamente conhecido (BROWN et al., 2012).

As doenças causadas por fungos afetam milhões de indivíduos ao redor do mundo, especialmente em países de baixa renda, onde seu gerenciamento não ocorre de forma adequada devido aos desafios no diagnóstico e pelas poucas opções terapêuticas (QUEIROZ-TELLES et al., 2017a, LIFE, 2018). A epidemiologia das infecções fúngicas varia de acordo com as áreas geográficas, reservatórios nosocomiais, condições socioeconômicas, exposição a antifúngicos e hábitos culturais. Por essa razão, o tratamento empírico normalmente se baseia no conhecimento da epidemiologia local associado com achados clínicos (BROWN et al., 2012; DIGNANI, 2014). No entanto, dados epidemiológicos para as micoses são notoriamente pobres, uma vez que tais doenças são frequentemente mal diagnosticadas (BROWN et al., 2012).

Essas infecções são causadas por dois tipos de microrganismos: patógenos primários e oportunistas. Os patógenos primários são aqueles capazes de estabelecer uma infecção em indivíduos saudáveis. Os oportunistas são capazes de causar doença no corpo humano devido a uma supressão do sistema imunológico, podendo ser causada até mesmo por microrganismos comensais de indivíduos saudáveis. Os fungos patogênicos podem ser ainda divididos em dois grandes grupos: filamentosos e leveduras. A maioria dos patógenos primários são fungos filamentosos, enquanto que a maioria dos oportunistas são leveduras (VANDEPUTTE et al., 2012; SANTANA, 2013).

De acordo com a extensão de envolvimento do tecido e o grau de resposta do hospedeiro ao organismo infectante, as micoses são categorizadas como superficiais, cutâneas, subcutâneas e sistêmicas. As infecções superficiais não causam nenhum tipo de inflamação. As que se enquadram na categoria cutânea causam inflamação e afetam a pele, incluindo cabelos e unhas. As infecções subcutâneas atingem as camadas internas de tecidos, incluindo fáscia profunda, ossos e músculos (RIVITTI e AOKI, 1999; ABDULLA e SAEED, 2015). As sistêmicas são normalmente adquiridas através da inalação de esporos tendo o pulmão como o foco primário

da infecção. Manifestações cutâneas são menos comuns neste último tipo, mas ocorrem com alta frequência em pacientes imunocomprometidos (DAWSON, DELLAVALLE e ELSTON, 2012; ASSIS, 2013).

Apesar das micoses serem mais raras quando comparadas com as infecções bacterianas, a ocorrência e severidade das primeiras tem crescido nas últimas décadas (CHEN et al, 2014; FUENTEFRIA et al., 2017; GARBEE, PIERCE e MANNING, 2017). O estudo das doenças causadas por fungos está atrasado em relação às de outros patógenos, e as micoses influenciam a cada dia mais o prognóstico de indivíduos gravemente imunocomprometidos. Além disso, o número de pacientes saudáveis que são acometidos com infecções fúngicas, principalmente em países de climas tropicais e subtropicais, vêm aumentando (BROWN et al., 2012; QUEIROZ-TELLES et al., 2017a).

Existem várias infecções fúngicas que apresentam diversidade em suas manifestações clínicas e grau de severidade que vão desde de simples infecção localizada a uma severa infecção sistêmica. Algumas dessas ocorrem mais frequentemente em países tropicais e por isso são chamadas de micoses tropicais, possivelmente por conta do clima dessas áreas ser mais favorável para o crescimento desses fungos (HAY, 2008; ABDULLA e SAEED, 2015). No entanto, elas podem ocorrer fora de países tropicais devido às imigrações (ABDULLA e SAEED, 2015).

O impacto médico de doenças fúngicas tropicais, assim como de outras micoses, são em grande parte desconhecido e muitas vezes subestimado. As micoses endêmicas podem ser divididas em dois grupos: de implantação (subcutâneas) e sistêmicas. As infecções fúngicas de implantação são um grupo heterogêneo de doenças, que se manifestam meses ou anos após a infecção inicial (QUEIROZ-TELLES et al., 2011, 2017a). Elas afetam principalmente os tecidos cutâneos e subcutâneos, mas também envolvem estruturas adjacentes, como linfáticos, cartilagens, fáscia, articulações e ossos (QUEIROZ-TELLES et al., 2013; 2017a). A maioria das micoses de implantação ocorre nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, como é o caso da cromoblastomicose e da ceratite fúngica filamentosa. Nessas últimas, a maior parte dos afetados são indivíduos envolvidos em atividades ao ar livre, tais como a agricultura, a caça e a mineração. Essas doenças mimetizam vários transtornos infecciosos e não infecciosos e suas prevalências são subestimadas por falta de diagnóstico (LUPI et al., 2005; QUEIROZ-TELLES et al., 2011, 2017a).

2.2. Ceratite fúngica filamentosa

2.2.1. Ceratite: aspectos gerais

As infecções fúngicas representam uma importante causa de morbidade ocular, sendo uma das principais causas de cegueira monocular ao redor do mundo, especialmente em populações marginalizadas (WHITCHER, SRINIVA e UPADYYAY, 2001; REFOJO et al., 2016; AUSTIN, LIETMAN e ROSE-NUSSBAUMER, 2017).

A ceratite, também chamada de queratite, é uma condição onde a córnea é infectada (ceratite infecciosa) ou danificada (ceratite estéril) (AHSAN e RAO, 2017). A ceratite infecciosa é uma doença causada por bactérias, fungos e protistas, que eventualmente invadem o estroma da córnea causando inflamação e, em última instância, destruição dessa estrutura (WONG et al., 2012; ANSARI, MILLER e GALOR, 2013; LAKHUNDI, SIDDIQUI e KHAN, 2017). A opacidade na córnea, muitas vezes causada pela ceratite infecciosa, é a quarta causa de cegueira mundial e é responsável por 10% das deficiências visuais que podem ser evitadas nos países subdesenvolvidos (PASCOLINI e MARIOTTI, 2012; WHO, 2016; AUSTIN, LIETMAN e ROSE-NUSSBAUMER, 2017).

A ceratite fúngica é uma micose de implantação negligenciada, embora seja um problema global. Em países desenvolvidos de clima temperado, casos esporádicos são relatados. Essa é uma infecção ocular refratária, potencial causadora de cegueira que leva à ulceração supurativa da córnea (THOMAS e KALIAMURTHY, 2013; HE et al., 2016). A doença é causada por fungos filamentosos e/ou leveduras, podendo representar mais de 50% de todas as culturas positivas para ceratite microbiana em países tropicais e subtropicais (XIE et al., 2006; THOMAS e KALIAMURTHY, 2013; LAKHUNDI, SIDDIQUI e KHAN, 2017). As úlceras causadas por fungos geralmente são mais severas do que as causadas por bactérias. Além disso, as primeiras possuem poucas evidências para guiar o tratamento (GOPINATHA et al., 2002; AUSTIN, LIETMAN e ROSE-NUSSBAUMER, 2017).

A ceratite filamentosa parece ser mais comum em latitudes tropicais e é frequentemente associada a pessoas que atuam em atividades agrárias, enquanto que a ceratite causada por leveduras afeta principalmente indivíduos imunocomprometidos (PRAJNA, PRAJNA e MUTHIAH, 2017).

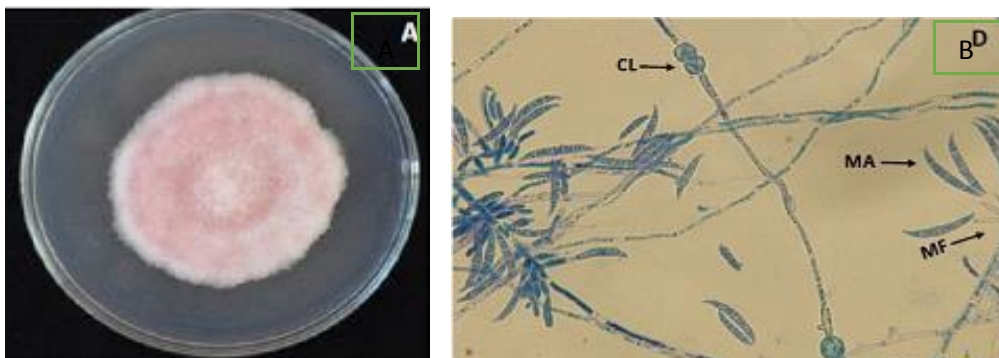
2.2.2. Etiologia

Os fungos filamentosos não são capazes de invadir a córnea intacta. A penetração só ocorre quando o epitélio é danificado de alguma forma (GOPINATHAN et al., 2009; THOMAS

e KALIAMURTHY, 2013; LAKHUNDI, SIDDIQUI e KHAN, 2017). As infecções por estes agentes ocorrem em córneas saudáveis devido à abrasão das mesmas pelo uso de lentes de contato e pelo uso de soluções desinfetantes inadequadas para limpeza destas. Também podem ser causadas devido a cirurgias ou insuficiência lacrimal. Entretanto, traumas na córnea causados por material vegetal é o principal fator causal relacionado a esta doença (ANSARI, MILLER e GALOR, 2013; BOURCIER et al., 2017).

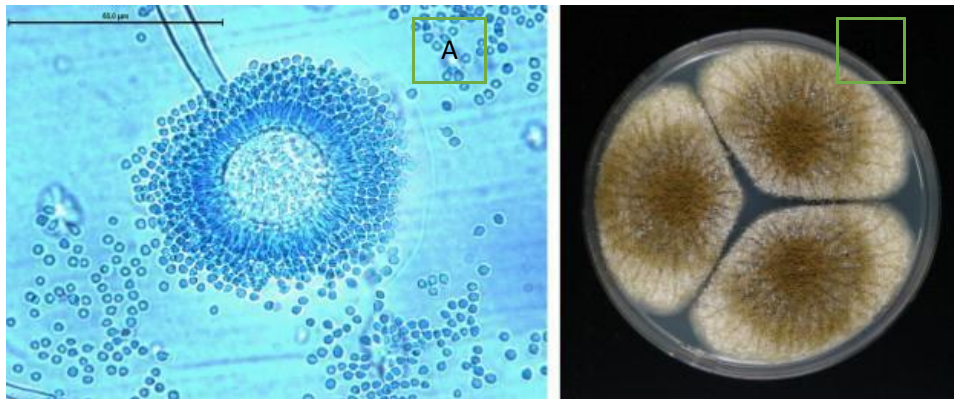
Mais de 70 espécies têm sido identificadas como causadoras da ceratite fúngica. *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Phaeohyphomycetes*, *Curvularia* spp., *Paecilomyces* spp. e *Scedosporium apiospermum* são os agentes mais associados à ceratite filamentosa fúngica (THOMAS e KALIAMURTHY, 2013; BOURCIER et al., 2017; LAKHUNDI, SIDDIQUI e KHAN, 2017). Os fungos filamentosos são responsáveis por causar mais de 60% das úlceras na córnea, sendo *Fusarium* (Figura 2.1) e *Aspergillus* (Figura 2.2) os dois gêneros mais predominantes (SRINIVASAN et al., 1997; LIN et al., 2016; CHIDAMBARAM et al., 2017). Um estudo clínico verificou que as infecções por *Aspergillus* spp. afetam pessoas com idade mais avançada. Além de causarem úlceras mais profundas em um número maior de pacientes quando comparadas com as causadas pelo gênero *Fusarium* (CHIDAMBARAM et al., 2017).

Figura 2.1 Aspectos macroscópico e microscópico do gênero *Fusarium*.



Legenda: A) Aspecto da colônia cultivada em ágar batata dextrose. B) Aspectos microscópicos vistos em exemplares no gênero através de microcultivo em ágar MALTE 2%: CL – Clamidósporos, MA – Macroconídios, MF – Monofíalides. Fonte: TEXEIRA, COELHO E TEBALDI, 2017.

Figura 2.2. Aspectos macroscópicos e microscópicos do gênero *Aspergillus*.



Legenda: A) Aspectos microscópicos da cabeça conidial B) Morfologia da colônia em meio sólido Extrato de Levedura Czapek. Fonte: BARANYI, et al., 2013.

Há evidências de que estes dois gêneros causam efeitos muito diferentes entre si com relação à cicatrização da córnea e na visão. A ceratite causada por *Aspergillus* spp. está associada à re-epitelização mais lenta, aumento do risco de perfuração e pior acuidade visual, quando em comparação com *Fusarium* spp. (SUN et al., 2014; CHIDAMBARAM et al., 2017). Um estudo mostrou que dentre o gênero *Aspergillus*, *A. fumigatus* seguido por *A. flavus* são os patógenos oportunistas mais comumente encontrados causando infecções sistêmicas e levando a infecções em humanos. Esses fungos são predominantemente associados com infecções oculares (ERDEN et al., 2017).

Entre as espécies patogênicas de *Fusarium*, *Fusarium solani* é a mais comum (encontrado em até 91% dos isolados), seguido por *F. oxysporum* e *F. dimerum*. (BHRARATHI et al., 2007; TUPAKI-SREEPURNA et al., 2017). Estudos mostram que 45% - 67% dos casos de ceratite fúngica no Brasil são causados por esse gênero (IBRAHIM et al., 2009; FURLANETTO et al., 2010; CARIELLO et al., 2011; OECHSLER et al., 2013). O espectro de espécies de *Fusarium* que causam ceratite depende de fatores geográficos e climáticos. Elas podem mudar entre populações que vivem em áreas rurais ou urbanas e entre países em desenvolvimento e desenvolvidos (SLAVIN e CHAKRABARTI, 2012; TUPAKI-SREEPURNA et al., 2017).

2.2.3. Habitat e epidemiologia

O padrão da epidemiologia da ceratite varia muito ao redor do mundo e até mesmo em regiões de um mesmo país. Estudos epidemiológicos indicam que a ocorrência dessa infecção

é mais alta em regiões quentes e úmidas, com economia agrícola (MANIKANDAN et al., 2008, 2013; KREDIC et al., 2015). As variações sazonais também influenciam, com casos sendo mais frequentes na primavera e no outono, durante o tempo da colheita de alguns países (GHOSH et al., 2016; BOURCIER et al., 2017). Estudos mostram que trabalhadores adultos ativos são o grupo mais frequentemente afetado. Esse fato é devido ao fato dos fungos filamentosos causadores dessa infecção, pertencem a um grande grupo de fungos hialinos ubíquos, presentes em climas temperados e tropicais (SMITH, 2007; TUPAKI-SREEPURNA et al., 2016). Deste modo, a atuação em profissões que trabalham ao ar livre (fazendeiros, agricultores, jardineiros) é um fator de risco. Isso também pode explicar o predomínio de homens afetados, os quais estão mais envolvidos nestas atividades (EPSTEIN, 2007; TUPAKI-SREEPURNA et al., 2017). Traumas na superfície da córnea e/ou o uso anterior de fármacos, como corticosteroides são outros fatores de risco (OECHSLER et al., 2013; HE et al., 2016, TUPAKI-SREEPURNA et al., 2017).

Há uma forte correlação geográfica com a ocorrência dos diferentes tipos de ceratite. A proporção de ceratite causada por leveduras é maior em climas temperados, enquanto que a ceratite fúngica filamentosa é responsável por apenas uma pequena porcentagem dos casos nessas regiões. As úlceras causadas por fungos filamentosos parecem ser mais comuns em países com áreas em latitudes tropicais, tais como Sul dos Estados Unidos, México, América Central, África, Meio Oriente, China, Índia e sudeste da Ásia (LECK et al., 2002; BOURCIER et al., 2017; LAKHUNDI, SIDDIQUI e KHAN, 2017).

A ceratite apresenta maior incidência nos países em desenvolvimento do que nos desenvolvidos. Essa diferença regional é consequência, principalmente, da frequência dos fatores de risco em cada população. Em países em desenvolvimento, o trauma ocular é responsável por 48 a 65% dos casos de úlcera de córnea, enquanto nos EUA, um dos principais fatores de risco é uso de lentes de contato, com 52% dos casos (ORMEROD, 1987; ERIE et al., 1993; UPADHYAY et al., 2001; MARUJO et al, 2013). Neste último país, o trauma ocular é responsável por apenas 27% dos casos (ERIE et al., 1993; MARUJO et al, 2013).

Dados epidemiológicos para essa micose no Brasil são escassos. Porém, estudos apontam que o país tem um grande número de casos de ceratite fúngica. Foram encontradas taxas entre 11% a 56% de todas as culturas microbianas positivas, sendo os fungos filamentosos os mais prevalentes (FURLANETTO et al., 2010; CARIELLO et al., 2011; MARUJO et al., 2013; OECHSLER et al., 2013). Ibrahim e colaboradores (2012) estudaram a sazonalidade da ceratite fúngica no Brasil através da venda de colírios antifúngicos. Os autores observaram relação do aumento de vendas desses medicamentos no terceiro trimestre do ano, que

corresponde aos meses de menor umidade do ar. Em outros países, tais como Índia e China, os fungos filamentosos podem ser agentes etiológicos de até 62% dos casos de ceratite (CHOWDHARY et al., 2005; XIE et al., 2006; OECHSLER et al., 2013).

A ceratite causada pelo gênero *Fusarium* é observada especialmente em trabalhadores ao ar livre. Contudo, o uso generalizado de lentes de contato vem aumentando drasticamente a incidência dessa micose. Sendo este gênero responsável por um surto ocorrido em nos EUA em 2007 (EPSTEIN, 2007; TUPAKI-SREEPURNA et al., 2016).

Até 1962, somente 38 casos de ceratite causada por *Aspergillus* spp. tinham sido reportados no mundo (MANIKANDAN et al., 2013). No entanto, nos últimos anos, espécies de *Aspergillus* vêm sendo reportadas frequentemente como agentes etiológicos dessa infecção (CARIELLO et al., 2011; MANIKANDAN et al., 2013; LIN et al., 2016; TUPAKI-SREEPURNA et al., 2017). Dentre 1737 culturas positivas de ceratite fúngica na Índia, as espécies de *Aspergillus* foram identificadas em 200 casos (11,5%), sendo *A. flavus* a espécie predominante (MANIKANDAN et al., 2013; ERDEN et al., 2017). Um caso relatou a infecção no Brasil por *A. flavus*, após cirurgia de cataratas. Apesar de ser menos frequente que *A. fumigatus*, segundo estes autores, a infecção causada pelo primeiro é mais virulenta e a espécie é mais encontrada no ar de algumas regiões geográficas (HEDAYATI et al., 2007; JAFARINASAB et al., 2012; COSTA et al., 2016).

2.2.4. Patogenia

A superfície ocular intacta dificulta a entrada da maioria dos microrganismos, mas uma vez que essas barreiras anatômicas são rompidas, as defesas do hospedeiro contra patógenos são menos eficientes para prevenir a infecção, o que pode levar à perda de visão (WONG et al., 2012; ANSARI, MILLER e GALOR, 2013; LAKHUNDI, SIDDIQUI e KHAN, 2017).

O curso temporal da infecção depende da virulência do fungo, do tamanho do inóculo e da resistência do hospedeiro. A progressão da ceratite fúngica é geralmente mais lenta do que a ceratite bacteriana. Os primeiros sinais aparecem várias horas ou dias após o trauma. No entanto, as infecções causadas por *Aspergillus* ou *Fusarium* podem progredir muito rapidamente e causar a perfuração da córnea e a endoftalmite, principalmente quando os pacientes fazem uso de corticosteróides. Infecções supurativas graves também podem resultar da infecção por fungos (BOURCIER et al., 2017).

A ocorrência de infecções fúngicas implicam em uma alteração nos sistemas de defesa contra infecções na córnea (barreira epitelial, filme lacrimal, ato de piscar). A resposta inflamatória da infecção depende da reprodução do fungo, de micotoxinas produzidas, das

enzimas secretadas e dos antígenos fúngicos (KARTHIKEYAN et al., 2011; BOURCIER et al., 2017). A formação de biofilme é um importante fator de patogenicidade, especialmente para fungos filamentosos tais como *Fusarium* spp. e *Aspergillus* spp. (MUKHERJEE et al., 2012; BOURCIER et al., 2017). Os corticosteroides e outros agentes imunossupressores facilitam o desenvolvimento de infecções causadas por fungos, devido à inibição da transcrição de citocinas e de quimiocinas pró-inflamatórias. Esses fármacos também diminuem a atividade dos macrófagos, assim como a habilidade de aderência dos neutrófilos (SAUER et al., 2008; BOURCIER et al., 2017).

A interação dos fungos com células hospedeiras é o fator chave na patogênese da ceratite micótica. A adesão de microrganismos às células hospedeiras é um pré-requisito para o início da infecção. Esses patógenos exibem uma variedade de adesinas capazes de aderir a vários tipos de células e interagem com uma variedade de proteínas e glicoproteínas presentes nas células hospedeiras (HOSTETTER, 1994; LAKHUNDI, SIDDIQUI e KHAN, 2017). No trauma ocular há uma expressão aumentada de glicoproteínas de manose na superfície da córnea. Além disso, há a presença de manoproteínas adesivas na superfície da parede celular de fungos. Essas moléculas presentes na superfície do olho traumatizado e dos agentes fúngicos parecem estar envolvidas na fisiopatologia da ceratite fúngica (LAKHUNDI, SIDDIQUI e KHAN, 2017).

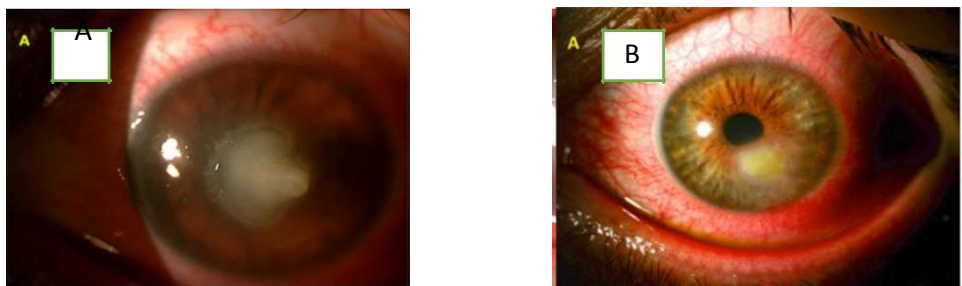
Na ceratite causada por *Fusarium* spp., o fungo é capaz de invadir a córnea até ter acesso à câmara anterior do olho. Lá, na área pupilar, ele forma uma massa fúngica na íris, a qual afeta a drenagem normal de humor aquoso, levando a um aumento da pressão intraocular. Esses eventos acarretam no surgimento do glaucoma maligno fúngico (KURIAKOSE et al., 1991). Inicialmente, pensava-se que este tipo de glaucoma ocorria apenas na ceratite causada pelo gênero *Fusarium*. Porém foi relatado um caso de glaucoma maligno induzido por *Aspergillus* spp.. Além disso, *A. flavus* também foi isolado da câmara anterior do olho (JAIN et al., 2007; LAKHUNDI, SIDDIQUI e KHAN, 2017).

Na ceratite micótica, uma grande carga fúngica pode superar a resposta inflamatória que ocorre no tecido da córnea, levando à multiplicação extensamente com uma penetração profunda nos tecidos levando à progressão da doença (LAKHUNDI, SIDDIQUI e KHAN, 2017). Vários fungos que causam a ceratite são conhecidos por produzirem micotoxinas. No entanto, o exato papel dessas na patogenicidade nessa doença ainda não foi esclarecido. Os fungos também têm a habilidade de produzir várias enzimas que podem danificar o tecido, facilitar a invasão e eventualmente influenciam a severidade e resultado da doença. As proteases parecem ter um papel na destruição severa da córnea.

2.2.5 Aspectos clínicos e laboratoriais

As infecções fúngicas da córnea precisam ser prontamente diagnosticadas para propiciar uma recuperação completa. No caso da ceratite fúngica filamentosa, as manifestações clínicas incluem um início repentino de dor, juntamente com fotofobia, visão reduzida e opacidade na superfície da córnea, o que sugere presença úlcera (ANSARI, MILLER e GALOR, 2013; LAKHUNDI, SIDDIQUI e KHAN, 2017). Essa infecção pode acometer qualquer parte da córnea (Figura 2.3). Dentre os achados típicos estão: o espessamento do epitélio e infiltrados, muitas vezes associados com lesões satélites. Um anel imune pode ser visto, o qual representa uma reação imunológica a antígenos fúngicos. A presença de lesão na córnea com aspecto seco é sugestiva de ceratite por fungos filamentosos. No caso de leveduras, nas margens não se visualizam hifas e são mais definidas, mostrando um infiltrado denso (ROSA et al., 1994; SRINIVASAN, 2004; THOMAS e KALIAMURTHY, 2013; LAKHUNDI, SIDDIQUI e KHAN, 2017). A presença de abscessos e hipópio (pus na câmara anterior do olho) são também observadas (Figura 2.4 - A e B) (ERDEN et al., 2017). A não responsividade a antibióticos e a piora com o uso de esteroides também são indicativos de ceratite fúngica (BOURCIER et al., 2017). Embora cada ceratite fúngica exiba características básicas, elas podem variar de acordo com o agente etiológico. A ceratite filamentosa severa e crônica se assemelha com a supuração bacteriana e pode envolver toda a córnea (SUN et al., 2007; LAKHUNDI, SIDDIQUI e KHAN, 2017).

Figura 2.3 – Diferentes partes da córnea afetada pelos fungos na ceratite filamentosa fúngica

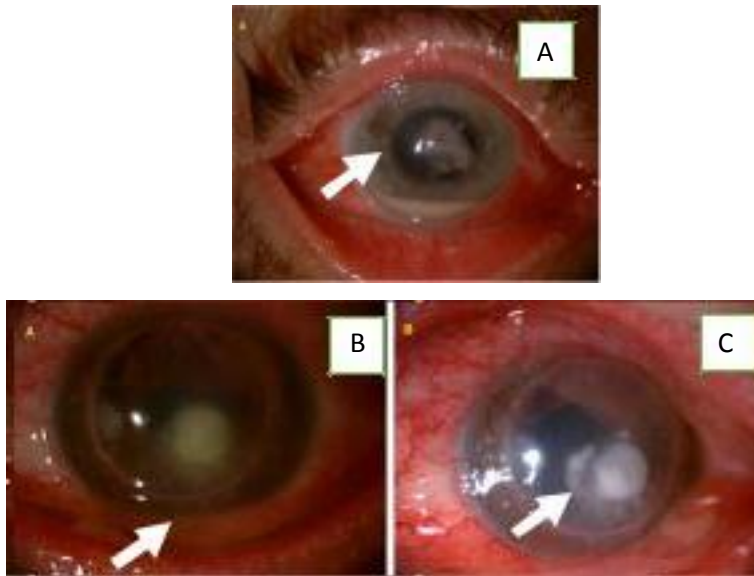


Legenda: A) Úlcera na córnea central com margens plumosas B) Úlcera superficial na região paracentral. Fonte: ERDEN et al., 2017.

A diminuição da acuidade visual é variável, e depende da localização das lesões na córnea (infiltrado, edema) em relação ao eixo visual, reação da câmara anterior e presença de secreções. Os fatores que favorecem um pior prognóstico incluem: atraso no diagnóstico superior a 2 semanas, pacientes com idade mais avançada, tamanho do infiltrado estromal,

tamanho do dano epitelial, pigmentação da úlcera, a presença de lesões satélite, a não resposta ao tratamento antifúngico inicial e infecção por *Aspergillus* spp. (KEAY et al., 2011; PRAJNA et al., 2012; WANG et al., 2015; SUN et al., 2016; BOURCIER et al., 2017).

Figura 2.4 – Aspectos clínicos na ceratite filamentosa fúngica.



Legenda: A) Úlcera central com bordas irregulares (seta), infiltração satélites e hipópio. B) Formação de abscesso e aumento do volume do hipópio (seta). C) Múltiplas infiltrações por satélite perilesionais (seta). Fonte: ERDEN et al., 2017.

A busca por um diagnóstico definitivo é altamente desejável, caso suspeite-se de ceratite fúngica. A raspagem da córnea é o método padrão de obtenção de um espécime. Para otimizar o diagnóstico, é preferível realizar o procedimento antes de qualquer tratamento antifúngico. É recomendável realizar exame micológico direto e cultural com o material obtido do raspado, bem como microcultivo para identificação do agente causal (BOURCIER et al., 2017; ROY et al., 2017 b).

2.2.6 Tratamento

Um manejo adequado da infecção, com um início rápido do tratamento podem reduzir a incidência da perda visual severa, bem como diminuir o dano da córnea (LAKHUNDI, SIDDIQUI e KHAN, 2017). Os medicamentos tópicos contra as infecções devem ser iniciados assim que as amostras para diagnóstico forem coletadas. O tratamento geralmente é escolhido empiricamente, considerando a gravidade das lesões, a impressão clínica inicial e os resultados do exame microbiológico direto. Se o paciente não for hospitalizado, é necessário um

acompanhamento ambulatorio próximo, incluindo um exame oftalmológico entre 24 a 48 horas (BOURCIER et al., 2017).

A ceratite fúngica é uma doença complexa, com muitas considerações em relação ao tratamento. Geralmente consiste de quimioterapia com fármacos tópicos e/ou sistêmicos, sozinhos ou em combinação com tratamentos cirúrgicos. No entanto, em países em desenvolvimento onde há barreiras econômicas e a limitação aos cuidados, essa micose é uma grande preocupação, uma vez que ela pode levar à perda da visão (AUSTIN, LIETMAN e ROSE-NUSSBAUMER, 2017).

Cada antifúngico tem seus benefícios e limitações e de idealmente deveriam ser escolhidos com cuidado, baseados no agente etiológico e em testes de susceptibilidade. Existem algumas classes de antifúngicos disponíveis como poliênicos, azólicos e pirimidinas fluoradas. Os poliênicos, incluindo a natamicina, nistatina e anfotericina B, atuam sobre a membrana fúngica, se ligando no ergosterol da célula fúngica. No entanto, como os tecidos da córnea dificultam a penetração desses fármacos, são recomendados apenas em casos de infecções superficiais (ANSARI, MILLER e GALOR, 2013; LAKHUNDI, SIDDIQUI e KHAN, 2017).

Apesar de ter atividade contra a maioria dos fungos filamentosos, a anfotericina B vêm mostrando atividade variável contra espécies de *Fusarium*. Além disso, em função dos efeitos adversos associados, esse fármaco não é considerado como primeira linha de tratamento (ANSARI, MILLER e GALOR, 2013; LAKHUNDI, SIDDIQUI e KHAN, 2017). A natamicina, por outro lado, tem um amplo espectro de atividade contra fungos filamentosos e é a primeira linha de tratamento contra a ceratite micótica, principalmente para as causadas por *Fusarium*. Esse fármaco, no entanto, só pode ser administrado topicamente, sendo assim usado apenas para tratar lesões superficiais. A presença de lesões profundas requer outros fármacos, como azólicos administrados por via subconjuntiva ou por via sistêmica (TANURE et al., 2000; LAKHUNDI, SIDDIQUI e KHAN, 2017).

Os azólicos, incluindo imidazólicos e triazólicos, inibem a síntese do ergosterol, causando danos às membranas das células fúngicas. O fluconazol e o cetoconazol apresentam uma boa penetração ocular, sendo assim são bons agentes contra as lesões profundas na ceratite. No entanto, o fluconazol tem um espectro de ação reduzido em relação aos fungos filamentosos. O cetoconazol é ativo contra *Aspergillus* spp., entretanto apresenta efeitos colaterais associados quando administrados por via sistêmica. O voriconazol é uma alternativa, pois possui menor incidência de efeitos adversos e é ativo contra fungos filamentosos, tais como *Fusarium* spp. Entretanto, possui alto custo (PANDA, SHARMA e ANGRA, 1996; MARANGON et al., 2004;

LALITHA et al., 2007; ANSARI, MILLER e GALOR, 2013; TATSUMI et al., 2013; LAKHUNDI, SIDDIQUI e KHAN, 2017).

A terbinafina é uma agente *antimicótico* sintético, da família das *alilaminas*, com propriedades tanto fungicidas como fungistáticas. Esse fármaco age inibindo a enzima esqualeno-epoxidase, bloqueando assim a síntese de ergosterol (LEYDEN, 1998; SCHIRALDI et al., 2016). Essa alilamina tem um amplo espectro de atividade contra fungos filamentosos e leveduras, exibindo uma potente ação fungicida contra espécies de *Aspergillus* (PETRANYI, 1987; RYDER, 1998; SCHIRALDI et al., 2016). Um estudo, com teste de susceptibilidade *in vitro* e *in vivo*, mostrou que a terbinafina poderia ser efetiva na inibição dos fungos causadores de infecções fúngicas na córnea (XUGUANG et al., 2007; TAYEL et al., 2013). Esse fármaco foi também usado em outro estudo para tratar a ceratite fúngica causada pelos gêneros *Fusarium* ou *Aspergillus*, sendo tão efetiva quanto a natamicina no controle da ceratite filamentosa. Também foi verificado que a terbinafina tem a habilidade de penetrar na córnea e no humor aquoso, atingindo níveis mais altos que a concentração inibitória e sem causar efeitos colaterais. No entanto, a frequência de aplicação (uma vez a cada hora durante o dia, uma vez a cada 2 h à noite) é necessária para manter concentrações eficazes no humor aquoso (LIANG et al., 2009; TAYEL et al., 2013; SHARMA, 2017).

O tratamento da ceratite fúngica requer administração de antimicóticos em forma de colírio para instalação tópica. No entanto, a drenagem contínua e o efeito de lavagem das lágrimas resultam em menos de 5% do medicamento aplicado para ser efetivo (URTTI, 2006; KOMPELLA et al., 2010; AHSAN e RAO, 2017). Outro fator a ser considerado no tratamento é o glaucoma ceratomicótico, causado principalmente por fungos filamentosos. Intervenções cirúrgicas são requeridas em casos de complicações de infecções agudas (KURIAKOSE et al., 1991; JAIN et al., 2007; LANKHUNDI, SIDDIQUI e KHAN, 2017). Um tratamento eficiente para a ceratite requer múltiplos desafios a serem ultrapassados. Um requisito fundamental é encontrar um equilíbrio na dosagem dos fármacos juntamente com a manutenção de concentrações terapêuticas por períodos prolongados (AHSAN e RAO, 2017).

2.3 Cromoblastomicose

2.3.1 Aspectos gerais

A cromoblastomicose, é uma das infecções fúngicas de implantação mais prevalentes, sendo a mais comum entre as doenças causadas por fungos dematiáceos (QUEIROZ-TELLES et al., 2017b). Apresenta-se como uma infecção crônica, granulomatosa, da pele e do tecido subcutâneo. Possui aspecto polimórfico, causada pela implantação do fungo, que leva à uma

hiperproliferação do tecido do hospedeiro, além da presença de uma fase fúngica patogênica, denominada de célula muriforme. Podem haver infecções bacterianas secundárias, as quais são responsáveis pela morbidade dessa doença, juntamente com a inabilidade da parte do corpo afetada ou da transformação das células escamosas em carcinoma (DABOIT, 2013; PORTO, 2016; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b).

A maior incidência de casos dessa doença se dá em homens que desempenham atividades agrícolas. Esse perfil de acometidos está relacionado ao fato dessas últimas atividades serem, em maior parte, exercidas por homens e pelo fato dos propágulos dos agentes causais estarem presentes no solo e vegetações. Mediante traumas ocorridos durante a labutação, esses fungos adentram o tecido, podendo desenvolver a infecção (RIBEIRO et al., 2006; PORTO, 2016). O fato dessa infecção afetar mais homens também está relacionado com fatores hormonais e genéticos, que podem desempenhar um papel na adaptação do fungo nos tecidos (HERNANDEZ-HERNANDEZ et al., 1995; DABOIT, 2013). Por ser considerada uma doença crônica, com um tempo de evolução das lesões, em média, entre 10 e 20 anos, a maior parte dos pacientes acometidos pela cromoblastomicose são adultos, com idade variável entre 30 e 50 anos (COSTA et al., 1991; PORTO, 2016).

As primeiras descrições dessa enfermidade fúngica datam do início do século passado. Em 1914, Max Rudolph, descreveu seis casos da doença, a qual ele descreveu como uma doença exótica, que acometia trabalhadores rurais do interior do Estado de Minas Gerais nomeando-a ‘figueira’. Rudolph reportou o isolamento de duas culturas pretas e aveludadas de quatro dos pacientes; as características microscópicas desses organismos eram bastante similares às de *Fonsecaea pedrosoi*, um dos agentes etiológicos mais comuns nessa região (RUDOLPH, 1914; CASTRO e CASTRO, 1987; DABOIT, 2013; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b).

Entretanto, o começo da pesquisa científica dessa doença começou em 1911, quando Pedroso e Gomes a descreveu pela primeira vez na cidade de São Paulo, Brasil. Após excluir leprose, esses pesquisadores observaram a presença de células acastanhadas esféricas em espécimes de biópsia cutânea, correspondentes às células muriformes, a marca do diagnóstico da cromoblastomicose. Essa doença foi inicialmente considerada intimamente associada à blastomicose e, conseqüentemente, esses autores intitularam a doença como ‘blastomicose negra’. Seus trabalhos, porém, somente foram publicados em 1920, devido a problemas relacionados à deflagração da Primeira Guerra Mundial (PEDROSO, 1920; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b).

Outra referência é de Medlar e Lane (1915), nos Estados Unidos, com menção à espécie *Phialophora verrucosa*, e o primeiro caso norte americano de cromoblastomicose. Doze anos

mais tarde, Fonseca e Leão apresentaram o gênero *Acroteca*. Em 1936, Negroni fundiu os aspectos morfológicos de *Acrotecae Hormodendrume* e criou o gênero *Fonsecaea*, bem como validou a espécie *F. pedrosoi*. O termo "cromoblastomicose" foi introduzido pela primeira vez por Terra et al. em 1922, sendo considerado adequado por McGinnis em 1983, no intuito de diferenciar a doença das demais causadas por fungos negros. Esta denominação é indicada pela *International Society for Human and Animal Mycology* desde 1992 (TERRA et al., 1922; ODDS et al., 1922; RIBEIRO et al., 2006; DABOIT, 2013; KRZYŚCIAK, PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA; PIASZCZYŃSKI, 2014; PORTO, 2016).

2.3.2 Etiologia

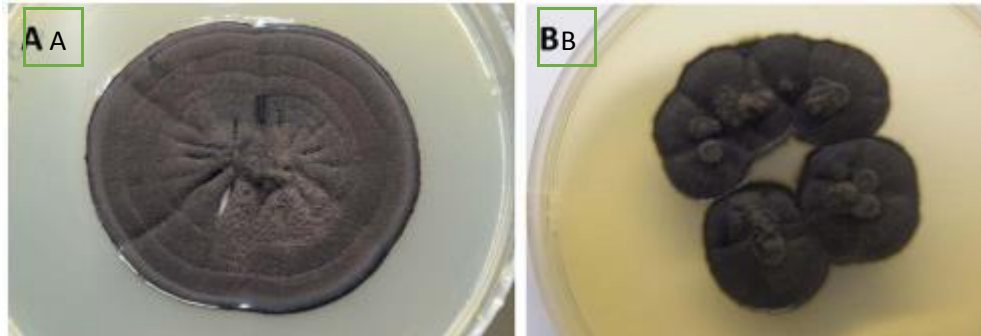
A cromoblastomicose ocorre pela inoculação traumática transcutânea de propágulos de diversas espécies de fungos filamentosos pertencentes a uma única família e ordem, Herpotrichiellacea e Chaetothyriales, respectivamente (NOSANCHUK e CASADEVALL, 2003). Os Chaetothyriales são particularmente conhecidos pelo gênero *Exophiala*, que compreende as chamadas "leveduras negras", as quais são capazes de se reproduzir por brotamento. A maioria dos fungos relacionados, incluindo todos os agentes da cromoblastomicose, são estritamente filamentosos. A melanina, que é derivada de dihidroxinaftaleno, está presente em células reprodutivas e vegetativas e, portanto, as colônias de Chaetothyriales apresentam tipicamente tons olivais, cinza escuro ou preto (Figura 2.5). Devido à essa característica são denominados fungos dematiáceos ou fungos negros (NOSANCHUK e CASADEVALL, 2003; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b).

Os principais gêneros causadores dessa infecção são: *Fonsecaea*, *Phialophora* e *Cladophialophora*, sendo o primeiro o mais prevalente e mais difícil de ser tratado (DABOIT, 2013; PORTO, 2016). Também são causadores desta micose *Rhinocladiella aquaspersa* e *Exophiala spinifera*. Estes fungos assemelham-se na pigmentação, estrutura antigênica, morfologia, propriedades fisiológicas e formação de conídios (McGUINNIS, 1983; DABOIT, 2013).

Quando se trata do gênero *Fonsecaea*, *F. pedrosoi* aparenta ser um patógeno intimamente relacionado com a cromoblastomicose, enquanto *F. monophora* é um patógeno oportunista, com um espectro clínico diverso, apesar de ser encontrado também causando cromoblastomicose (DABOIT et al., 2013; KRZYŚCIAK, PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA; PIASZCZYŃSKI, 2014). Outras espécies de fungos dematiáceos vêm sendo descritas como agentes da cromoblastomise, tais como: *Fonsecaea nubica* e *Phialophora richardsiae*, *F. pugnacius*, *Cyphellophora ludoviensis* e *Rhinocladiella tropicalis*. Esses últimos agentes

afetam principalmente indivíduos imunocomprometidos (KRZYŚCIAK, PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA; PIASZCZYŃSKI, 2014; DE AZEVEDO et al., 2015; GOMES et al., 2016).

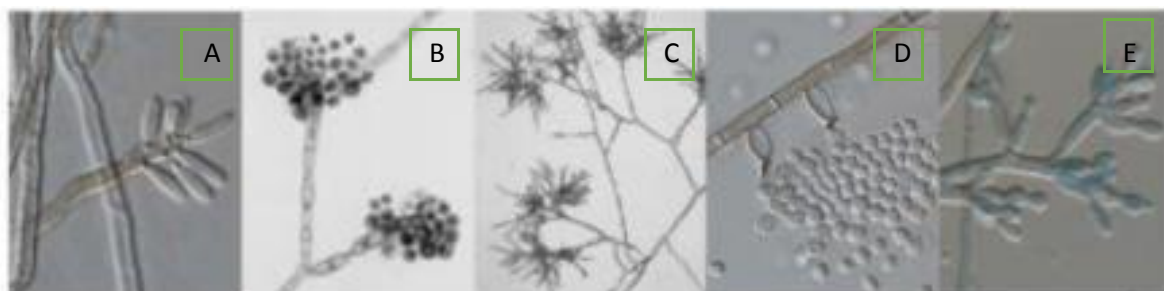
Figura 2.5. Aspecto macroscópico de colônias de agentes da cromoblastomicose.



Legenda: *Cladophialophora carrionii* (A) e *Fonsecaea pedrosoi* (B), ambos cultivados por 28 dias, em ágar Sabouraud a 30 °C. Fonte: RASAMOELINA et al., 2017.

A distinção entre os gêneros é feita pela morfologia do seu modo clonal de reprodução (Figura 2.6). As espécies de um mesmo gênero são, na maioria das vezes, morfologicamente indistinguíveis entre si. Para uma identificação confiável em nível de espécie, é necessário o sequenciamento de genes (de HOOG et al., 2000; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b).

Figura 2.6 Distinção morfológica dos gêneros da família Herpotrichiellacea.



Legenda: Em *Rhinocladiella* spp. (A) os conídios estão dispostos simpodialmente em extensões celulares alongadas; em *Exophiala* spp. (B) as células que produzem conídios são anelídicas; em *Cladophialophora* spp. (C), os conídios estão dispostos em cadeias longas e secas; em *Phialophora* spp. (D), o conidióforo lembra uma ‘jarra’ com conídios implantados na extremidade. No gênero *Fonsecaea* (E), as células são agrupados em dentículos e dispostos em cadeias curtas. Fonte: QUEIROZ-TELLES et al., 2017b.

2.3.3 Habitat e epidemiologia

A cromoblastomicose é mais prevalente em regiões tropicais e subtropicais do planeta. A maioria dos casos são reportados na América Latina, Caribe, África e Ásia. Na América do Sul, a maioria dos casos de cromoblastomicose foram descritos no Brasil. Com exceção do Chile, essa infecção foi relatada em todos os países deste subcontinente. Depois do Brasil, a Venezuela e a Colômbia representam a maioria dos casos de cromoblastomicose. No nosso País, a cromoblastomicose é endêmica em muitas áreas geográficas, especialmente nas regiões Norte e Nordeste, onde 872 casos foram relatados retrospectivamente nas últimas três décadas (MELLO et al., 1992; SILVA, SOUZA e ROZENTAL, 1998; PIRES et al., 2012; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b).

Um estudo mostrou a diversidade da população das cepas clínicas de cromoblastomicose obtidas no Brasil. Em 80% dos casos foi encontrado o agente etiológico *F. pedrosoi*, 13% de *F. monophora*, 3% de *F. rubica* e um caso de *F. pugnacius*. Apesar de serem consideradas raras nas Américas, espécies de *Rhinocladiella* e espécies semelhantes à *Phialophora* foram encontrados (4%). Além disso, duas novas espécies, as quais foram nomeadas de *Cyphellophora ludoviensis* e *Rhinocladiella tropicalis* foram identificadas como causadoras da doença (GOMES et al., 2016). Diferenças na prevalência de gêneros causadores da cromoblastomicose foram observadas: *F. pedrosoi* é relatado em áreas úmidas de clima tropical e subtropical, enquanto *C. carrionii* é dominante em clima semiárido (BONIFAZ, VAZQUEZ-GONZÁLEZ e PERUSQUÍA-ORTIZ, 2010; DABOIT, 2013; KRZYŚCIAK, PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA; PIASZCZYŃSKI, 2014; GOMES et al., 2016).

A cromoblastomicose está fortemente associada às atividades agrícolas, o que destaca a natureza ocupacional desta doença (AI-DOORY, 1983). Durante as atividades na lavoura, indivíduos que vivem em áreas endêmicas, provavelmente são infectados através de traumas relacionados a materiais provenientes do ambiente (plantas e espinhos, por exemplo) ou ainda pelo contato de uma ferida já existente com o solo contaminado. No entanto, os agentes etiológicos dessa infecção são difíceis de serem recuperados a partir do ambiente, devido ao seu estilo de vida saprobiótico (QUEIROZ-TELLES et al., 2017 b). Os fungos causadores da cromoblastomicose habitam locais onde há presença de compostos monoaromáticos, os quais são substâncias tóxicas. Na natureza, esses compostos são encontrados em detritos de plantas, espinhos e córtex de madeira (VICENTE et al., 2008; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b).

Uma potencial fonte de infecção foi reportada em uma área endêmica localizada no Estado do Maranhão-Brasil, às margens da floresta amazônica, onde centenas de famílias estão

envolvidas com a colheita do coco do babaçu (*Orbignya phalerata*). Habitantes locais coletam a castanha desse fruto, que é rica em óleo e é utilizada na manufatura de cosméticos. Devido à presença do óleo, fungos da ordem Chaetothyriales estão presentes nos fragmentos das cascas desse coco. Traumas podem ser causados durante a quebra do coco, o que faz a colheita do babaçu ser considerada um fator de risco para o desenvolvimento de cromoblastomicose (MARQUES et al., 2006; QUEIROZ-TELLES, 2015). O babaçu é uma planta nativa também do Estado do Piauí. Um estudo epidemiológico realizado no Estado do Rio de Janeiro apontou que dentre os indivíduos submetidos a tratamento devido à cromoblastomicose, um deles tinha residência no Piauí (MOUCHALOUAT et al., 2011). Levando-se em conta que este último Estado é vizinho ao Maranhão, e que a extração do coco também envolve várias famílias, este Estado também pode ser considerado uma área endêmica dessa micose.

2.3.4 Patogenia

Os fungos dematiáceos induzem um amplo quadro de micoses, dentre elas a cromoblastomicose, cujos aspectos clínico-laboratoriais são decorrentes das interações dinâmicas que se estabelecem entre estes e o hospedeiro (PORTO, 2016). Vários fatores de virulência estão provavelmente envolvidos nesta doença, tais como a formação de células muriformes ou escleróticas, a adesão do fungo, a presença de moléculas hidrofóbicas e a quantidade de melanina. Os mecanismos imunológicos do hospedeiro contra agentes da cromoblastomicose não são bem compreendidos. Alguns trabalhos avaliaram a resposta celular na interação hospedeiro-fungo, sugerindo que a persistência fúngica *in situ* é o principal fator responsável pela evolução da cromoblastomicose (SALGADO, 2010; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b).

Após a implantação transcutânea, propágulos de agentes da cromoblastomicose apresentam uma plasticidade celular e morfológica única, formando as células muriformes (formas parasitárias encontradas no hospedeiro). A formação destas células é restrita aos Chaetothyriales, que atuam como formas invasivas no tecido vivo, humano ou vegetal (de HOOG, 1993). As células muriformes são consideradas um mecanismo de adaptação evolutiva para permitir a sobrevivência do fungo dentro do microambiente do hospedeiro. Elas estão diretamente associadas a uma intensa resposta granulomatosa, bem como à evasão de mecanismos imunológicos, os quais sinalizam o desenvolvimento da cronicidade associada a esta doença. O tempo de conversão de conídios para células muriformes foi estimado em 6 dias, em estudos *in vitro* (SEYEDMOUSAVI et al., 2004; ESTERRE-QUEIROZ, 2006; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b).

A aderência e a hidrofobicidade são dois importantes fatores de virulência fúngica (SANTOS et al., 2007). Na cromoblastomicose, esporos e hifas podem aderir dentro do tecido epitelial do hospedeiro, levando à diferenciação em células muriformes. Estas últimas resistem à morte que poderia ser induzida pelos mecanismos de defesa do hospedeiro e permitem a evolução da inflamação granulomatosa crônica. A presença de moléculas extracelulares de polissacarídeos aumentam esse fenômeno por conta da hidrofobicidade (QUEIROZ-TELLES et al., 2017b). A termotolerância é um dos principais fatores de virulência entre os Chaetothyriales. As espécies patogênicas de *Fonsecaea* apresentam desenvolvimento ótimo a 33 °C, sendo termotolerante até a temperatura de 37 °C. Estas temperaturas são ligeiramente superiores para as espécies estritamente ambientais (VICENTE et al., 2014; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b).

Diferentes componentes da membrana e da parede celular podem contribuir para a virulência fúngica na cromoblastomicose, incluindo a melanina. Ela é largamente encontrada na natureza, sendo considerada um componente imunologicamente ativo, funcionando como importante fator de virulência em diferentes fungos patogênicos (NOSANCHUK e CASADEVALL, 2003; LANGFELDER et al., 2003; QUEIROZ-TELLES et al., 2017 b). O pigmento negro da parede celular fúngica dos agentes da cromoblastomicose, além de favorecer a capacidade fotoprotetora, permitindo aos fungos o desenvolvimento em ambientes ensolarados, atua também como um fator de virulência (PORTO, 2016). A melanina é uma macromolécula complexa, hidrofóbica e negativamente carregada. Os mecanismos pelos quais a esta contribui para aumentar a resistência dos fungos contra as células imunes dos hospedeiros são: a proteção contra enzimas proteolíticas, a proteção contra espécies reativas de nitrogênio e oxigênio e a redução da fagocitose (NOSANCHUK e CASADEVALL, 2003; REVANKAR e SUTTON, 2010; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b).

2.3.5 Aspectos clínicos e laboratoriais

Após propágulos de agentes etiológicos ganharem acesso através das barreiras cutâneas, usualmente em áreas do corpo não protegidas, há o desenvolvimento de lesão cutânea inicial, restrita ao local de infecção. Essa lesão é seguida por um envolvimento progressivo e crônico das estruturas cutânea e subcutânea do tecido e de uma resposta fibrosa granulomatosa, com microabscessos e, muitas vezes, com proliferação de tecidos. Esses eventos são decorrentes de uma resposta imune não protetora de células Th2, com envolvimento humoral ineficaz e pela presença de células muriformes no tecido afetado. O período entre a inoculação e o surgimento da lesão inicial não é padrão, podendo variar de semanas a meses, sendo que alguns pacientes

nem mesmo lembram-se de ter sofrido algum ferimento no local (RIPPON, 1982; BAYLES, 1986; QUEIROZ-TELLES et al., 2015, 2017b).

Diferente de outras micoses de implantação, como esporotricose e o micetoma, a cromoblastomicose é limitada ao tecido subcutâneo, não afetando fáscia, tendões, músculos e áreas osteoarticulares (BONIZAZ, VAZQUEZ-GONZALVES e PERUSQUÍA-ORTIZ, 2010). No entanto, essa infecção progride lentamente, e por contiguidade, produz mudanças fibróticas e estase linfática, levando ao linfodema, o que em alguns casos se assemelha à elefantíase. Infecção bacteriana secundária recorrente é outra observação frequente em cromoblastomicose (BONIFAZ, CARRASCO-GERARD e SAUL, 2001; OGAWA et al., 2003; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b).

As lesões da cromoblastomicose podem ser classificadas de acordo com sua gravidade: leve, moderada e severa (Figura 2.7). Este último tipo tende a ser não responsiva ou responder lentamente à terapia antifúngica (CARRION, 1950; DABOIT, 2013). Carrión, classificou e caracterizou as lesões em cinco tipos diferentes: nodular, placa, tumoral, verrucosa e cicatricial (Figura 2.8), sendo as quatro primeiras as mais frequentes. Em casos avançados, mais de um tipo de lesão pode ser observada no mesmo paciente. A doença pode levar à incapacidade do membro atingido devido à sequela fibrótica e à uma série de complicações clínicas. Se não for diagnosticada em um estágio precoce, a doença pode tornar-se refratária à terapia (QUEIROZ-TELLES et al., 2017 b).

Figura 2.7. Lesões da cromoblastomicose com diferentes graus de severidade.



Legenda: A) Forma leve B) Moderada e C) Severa. Fonte: Queiroz-Telles et al., 2017b.

Na maioria dos casos, as lesões são unilaterais e situam-se nos membros inferiores. Com menor frequência aparecem nos membros superiores e raramente na região glútea ou face (DABOIT, 2013; KRZYŚCIAK, PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA; PIASZCZYŃSKI, 2014; PORTO, 2016). Devido ao fato das lesões serem clinicamente polimórficas, são comumente diagnosticadas de forma incorreta, visto que mimetizam um amplo espectro de doenças com causas infecciosas e não infecciosas. O diagnóstico deve ser confirmado por exames micológico direto e histopatológico (GARNICA, NUCCI e QUEIROZ-TELLES, 2009; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b).

Figura 2.8. Aspectos clínicos das lesões da cromoblastomicose.



Legenda: A) Lesão verrucosa B) Lesões nodular (seta preta) e cicatricial (seta laranja) C) Lesões verrucosas (seta preta) e nodulares (seta laranja). Fonte: GOMES et al., 2016.

Todos os agentes causadores geram as mesmas formas parasitárias, conhecidas como células muriformes, escleróticas, fumagóides ou corpos de Medlar (Figura 2.9). Estas, são estruturas arredondadas, com 4 a 12 μm de diâmetro, que podem estar soltas ou agrupadas (2 a 4 células), de paredes espessas e de cor acastanhada, com paredes transversais longitudinais (RIPPON, 1982; DABOIT, 2013; KRZSCIAK; PIASZCZYBSKA; PIASZCZYBSKI, 2014; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b). As células muriformes típicas são usualmente observadas na epiderme, entretanto elas podem mudar para a forma filamentosa, especialmente nas crostas que recobrem as lesões (KRZYŚCIAK, PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA; PIASZCZYŃSKI, 2014).

A visualização de células muriformes em um espécime clínico é obrigatório para confirmação do diagnóstico desta doença, tanto na histopatologia quanto no exame direto. A sensibilidade deste último varia de 90 a 100%. Esse método é rápido, fácil e barato. A terapia

pode ser iniciada imediatamente após identificação dessas estruturas típicas. No entanto, a identificação do fungo causador da lesão através do exame cultural é importante, porque espécies de *Fonsecaea* parecem ser menos sensíveis aos antifúngicos do que *C. carrionii*. Além disso, a identificação pode contribuir com dados sobre epidemiologia (BORELLI, 1987; MCGINNIS e PASARELL, 1988; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b).

Figura 2.9. Células muriformes visualizadas em exame micológico direto.



Legenda: Visualização em aumento de 100X. Fonte: PURIM et al., 2017.

2.3.6 Tratamento

O resultado clínico dos pacientes com cromoblastomicose é determinado pela atividade antimicótica intrínseca do medicamento utilizado, do seu perfil farmacológico, assim como também da apresentação clínica e da gravidade da infecção (QUEIROZ-TELLES et al., 2017b).

Durante o século passado, desde que o primeiro caso de cromoblastomicose relatado, diversos regimes terapêuticos foram descritos na literatura. Esses regimes incluem métodos terapêuticos físicos de destruição, excisão cirúrgica, bem como terapia tópica e sistêmica. Com exceção das pequenas lesões iniciais, que podem ser excisadas cirurgicamente, as manifestações mais extensas dessa infecção são refratárias e a cura é quase impossível de ser alcançada (QUEIROZ-TELLES e SANTOS, 2013; KRZYŚCIAK, PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA; PIASZCZYŃSKI, 2014; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b). Em vista disso, não é possível eleger uma terapia ou fármaco de escolha, sendo essa infecção umas das micoses mais difíceis de erradicar (DABOIT, 2013; KRZYŚCIAK, PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA; PIASZCZYŃSKI, 2014).

Com relação aos fármacos antifúngicos, ainda hoje poucas opções estão disponíveis. A terapia com estes agentes consiste em longos períodos com doses elevadas (MARTINEZ e TOVAR, 2007; DABOIT, 2013). De acordo com vários ensaios clínicos abertos e não

comparativos, o itraconazol é o fármaco mais utilizado e com melhores resultados para cromoblastomicose. Ainda assim suas taxas de cura variam de 15 a 80% (QUEIROZ-TELLES et al., 1992; BONIFAZ, CARRASCO-GERARD e SAUL, 2001; AGARWAL et al., 2017; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b). As doses recomendadas para adultos e adolescentes são de 200 a 400 mg/dia, dependendo da gravidade da infecção. A duração do tratamento varia, porém, a maioria dos casos mostra melhoras em 8 a 10 meses. As formas graves tendem a mostrar uma melhoria após vários meses da terapia, porém a cura raramente é observada. Após o término da terapia, as recaídas são frequentemente observadas, presumivelmente porque itraconazol é um agente fungistático. Assim com outros triazólicos, o itraconazol inibe a biossíntese do ergosterol da membrana através da inibição da lanosterol 14 α -demetilase, uma coenzima do citocromo P450. A falta de ergosterol gera membranas celulares defeituosas, as quais perdem fluidez e se tornam mais permeáveis (GRANT e CLISSOLD, 1989;

KRZYŚCIAK, PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA; PIASZCZYŃSKI, 2014; QUEIROZ-TELLES et al., 2017 b). Os resultados clínicos com o itraconazol são variáveis, limitados principalmente por deficiências de absorção intestinal e, conseqüentemente, baixos níveis plasmáticos e nos tecidos (KUMARASINGHE e KUMARASINGHE, 2000; KRZYŚCIAK, PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA; PIASZCZYŃSKI, 2014; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b).

A terbinafina é o segundo agente antifúngico mais utilizado para o tratamento da cromoblastomicose. Esse fármaco tem taxas de cura semelhantes ao itraconazol (ESTERRE et al., 1996; TANUMA et al., 2000; BONIFAZ et al., 2005; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b).

É um derivado de alilamina com efeitos fungistático e fungicida, agindo através da inibição da esqualeno epoxidase, interferindo na biossíntese de ergosterol, e conseqüentemente, na função da membrana fúngica. Ao contrário dos derivados triazólicos, que são metabolizados através da via do citocromo P450 3A4, a terbinafina é metabolizada através da via do citocromo P450 2D6. Assim, as interações medicamentosas e risco de efeitos colaterais a longo prazo são mínimas com esta alilamina (KRZYŚCIAK, PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA; PIASZCZYŃSKI, 2014; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b). Em geral, a terbinafina mostra boa atividade *in vitro* contra a maioria dos agentes da cromoblastomicose. As doses recomendadas são de 250 a 500 mg/dia. A duração do tratamento varia, até que a cura micológica ou até que a resolução das lesões da pele seja alcançada. Casos clínicos relatam melhora quando a terbinafina é administrada em combinação com outros fármacos (QUEDRAOGO et al., 2017). Ela pode ser vantajosa em relação ao itraconazol, na medida em que mostra menos interações com outros fármacos e pode exercer uma ação antifibrótica relevante (ESTERRE et al., 1996;

ESTERRE e QUEIROZ-TELLES, 2006; SILVA-ROCHA et al., 2013; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b).

Por quase 30 anos a anfotericina B foi o único fármaco disponível para o controle de uma série de infecções fúngicas. Esse polieno interage com os esteróis da membrana fúngica, resultando na produção de poros, os quais são formados por um anel composto por oito moléculas de anfotericina B ligadas hidrofobicamente aos esteróis da membrana. Esses poros, alteram a permeabilidade da membrana, levando ao extravasamento de componentes citoplasmáticos vitais e à morte do organismo (de KRUIJFF e DEMEL, 1974; HOLZ, 1974; KERRIDGE, 1985; GHANNOUM e RICE, 1999). Devido ao fato de causar nefrotoxicidade, esse fármaco não é considerado uma terapia de primeira linha, dado que tal toxicidade não permite a sua utilização em longo prazo (MARTINEZ e TOVAR, 2007; DABOIT et al., 2013). Além disso, um estudo *in vitro* mostrou que os agentes da cromoblastomicose apresentam baixa suscetibilidade a este fármaco. O mesmo estudo, porém, mostrou o efeito sinérgico da anfotericina B quando em associação com a terbinafina em praticamente todos os isolados testados (DABOIT et al., 2014).

O desenvolvimento de novos medicamentos para infecções fúngicas invasivas favoreceu seu uso na terapia das micoses endêmicas, incluindo a cromoblastomicose. Dentre os triazólicos de amplo espectro, o posaconazol é a melhor opção para o tratamento de todas as apresentações clínicas dessa infecção (NEGRONI et al., 2005; CHOWDHARY et al., 2014; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b). A dose recomendada da suspensão oral desse fármaco em pacientes com cromoblastomicose é de 800 mg/dia, dividida em duas doses, por longos períodos (ANTONELO et al., 2010). Espera-se que formulações de posaconazol licenciadas recentemente, ou seja, comprimidos orais e soluções intravenosas, também possam ser avaliadas em pacientes com essa doença. Uma ênfase especial deve ser dada em comprimidos posaconazol de liberação retardada. Em pacientes neoplásicos, esta formulação parece ser minimamente afetada por fatores como ingestão de alimentos, aumento do pH gástrico, motilidade prejudicada ou mucosite. Dados revelaram que estes comprimidos também podem atingir concentrações plasmáticas médias maiores do que as obtidas com a solução oral e são bem tolerados em indivíduos saudáveis (KRAFT et al., 2014; JUNG, TVERDEK e KONTOYIANNIS, 2015). A combinação de posaconazol com terbinafina pode ser uma potencial terapia para casos refratários. A limitação desse fármaco é seu alto custo (KRZYŚCIAK, PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA; PIASZCZYŃSKI, 2014; QUEIROZ-TELLES et al., 2017 b).

A cromoblastomicose é uma micose crônica, que é resistente à maioria dos tratamentos e propensa à recorrência. Os pacientes que apresentam formas clínicas moderadas a severas desta doença ainda são um verdadeiro desafio terapêutico (QUEIROZ-TELLES e SANTOS, 2013; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b). As terapias de combinação, com medicamentos antifúngicos sistêmicos, têm sido usadas na terapia de pacientes com micoses refratárias invasivas. Uma combinação de agentes antifúngicos e/ou métodos físicos é, geralmente, a última opção terapêutica para apresentações clínicas refratárias ou avançadas de cromoblastomicose. A combinação de itraconazol e terbinafina é freqüentemente usada em pacientes com doença refratária e/ou casos que não respondem aos tratamentos anteriores (ANTONELLO et al., 2010; DABOIT et al., 2014; QUEIROZ-TELLES et al., 2017 b).

2.4 Teste de avaliação da atividade antifúngica

Métodos laboratoriais para guiar a seleção de terapia antifúngica foram desenvolvidos a partir do aumento na incidência de infecções sistêmicas fúngicas, do surgimento de cepas resistentes, da disponibilidade de novos fármacos, do aumento do consumo de antifúngicos disponíveis para tratamento e prevenção das infecções fúngicas invasivas, bem como pela ocorrência de falhas terapêuticas no tratamento destas infecções (CLSI, 2008a, 2008b; CARVALHO, 2012).

A organização americana *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), anteriormente denominada *Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) desenvolveu metodologias de referência para avaliação de atividade antifúngica. O primeiro método de referência (M27-A) para a avaliação da atividade antifúngica de substâncias puras, foi publicado em 1997, com o estabelecimento do controle de qualidade das variações da CIM e o desenvolvimento de pontos de corte. Esse método é um teste de diluição em caldo para determinação da susceptibilidade de *Candida* spp. (incluindo *C. glabrata*) e *Cryptococcus neoformans* aos fármacos, que apresenta a grande vantagem de propiciar alta reprodutibilidade entre laboratórios (CARVALHO, 2012; CLSI 2008b). Os testes de avaliação da sensibilidade aos antifúngicos *in vitro* destinam-se a determinar a concentração fungicida mínima (CFM) ou a Concentração Inibitória Mínima (CIM). O parâmetro mais tradicional para avaliar a sensibilidade a antifúngicos é a CIM (CARVALHO, 2012), que é a menor concentração de um agente antifúngico que inibe substancialmente o crescimento de um microrganismo (CLSI, 2008a, 2008b).

Em 2002, foi publicado um método de referência (norma M38-A) para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de fungos filamentosos à terapia antifúngica. Essa

norma descreve um método para testar a sensibilidade dos fungos filamentosos, incluindo os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus arrhizus*, *Pseudallescheria boydii* (*Scedosporium apiospermum*) e *Sporothrix schenckii*, assim como outros fungos patogênicos oportunistas, aos agentes antifúngicos. O documento incluía a seleção dos agentes antifúngicos, o preparo de soluções-padrão e de diluições de antifúngicos usadas na realização dos ensaios, implementação e interpretação dos testes. A norma M38-A também incluía a preparação e tamanho do inóculo, tempo de incubação e temperatura, formulação do meio e critérios para determinação da CIM. (CLSI, 2002; CLSI 2008a). A norma M38-A2 publicada em 2008 incorporou material suplementar: dados de controle de qualidade para fungos isolados, assim como guias para testes de equinocadinas. Métodos para teste de dermatófitos também foram fornecidos (CLSI, 2008a).

O teste de microdiluição em caldo preconizado pelo CLSI é realizado em placas estéreis com 96 poços, e consiste na exposição de um inóculo de um determinado microrganismo a dez concentrações de um fármaco ou substância teste, onde é possível observar o efeito destes sobre o crescimento fúngico. É requerido um tempo de incubação e, na sequência, a CIM é determinada visualmente (CLSI 2008a, 2008b).

2.5. Combinação de fármacos

A taxa de resistência a antifúngicos vem crescendo em décadas recentes, porém o desenvolvimento de novos agentes antimicóticos não segue esse mesmo crescimento. Baseado nisso, a ideia de combiná-los aparece como uma alternativa para os clínicos (CAMPITELLI et al., 2017).

A combinação de fármacos surgiu como uma abordagem para melhorar a eficácia da terapia antimicrobiana para infecções difíceis de tratar (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2014; SVETAZ et al., 2016). A principal vantagem desse método é atingir um efeito antifúngico sinérgico com poucas quantidades de cada componente, reduzindo os efeitos colaterais e o surgimento de resistência (KONTOYIANNIS e LEWIS, 2002; SVETAZ et al., 2016). Esse quadro é atingido quando os antifúngicos utilizados em combinação aumentam a eficácia de cada fármaco, utilizando uma dose menor de cada um deles. Os benefícios farmacológicos seriam cumulativos, com cada fármaco atuando em dois alvos diferentes na célula fúngica. Ou até mesmo ambos compostos atuando em um mesmo alvo, potencializando o estímulo. Nesse sentido, a terapia de combinação pode ser utilizada na tentativa de prevenir ou atrasar a emergência de resistência *in vivo* do fungo patogênico (FISHMAN, 2002; LUPETTI et al., 2003; CUENCA-ESTRELLA, 2004; WORTHINGTON e MELANDER, 2013).

Do ponto de vista da interação entre substâncias medicamentosas pode haver indiferença, antagonismo ou sinergismo. A indiferença farmacológica ocorre, quando da associação de dois medicamentos, o mecanismo de ação de um não interfere no mecanismo de ação do outro, os dois medicamentos não interagem sob nenhum aspecto de sua ação farmacodinâmica ou farmacocinética. No antagonismo, a resposta farmacológica de um medicamento é suprimida ou reduzida na presença de outro através de mecanismos químicos, farmacocinéticos, competição ou mesmo bloqueio de um mesmo receptor (OLIVEIRA, 1986; AGUIAR, 2014). No sinergismo existe a associação de dois ou mais medicamentos, cuja ação resultante é maior do que a simples soma dos efeitos isolados de cada um deles (VAN VUUREN e VILJOEN, 2011; AGUIAR, 2014).

Para determinar o tipo de interação que ocorre entre os fármacos, um método bem elaborado deve ser usado. Os métodos mais utilizados e também mais simples para detectar interações *in vitro* entre duas substâncias são: o de difusão de disco qualitativo, a técnica do tabuleiro de xadrez, a construção de isobogramas e os estudos de curva de morte (SVETAZ et al., 2016).

A técnica do tabuleiro xadrez é uma das técnicas mais frequentemente usadas para avaliar combinações antimicrobianas *in vitro*. O termo tabuleiro de xadrez se refere ao padrão, dos tubos ou nas placas de microtitulação, formados pelo teste de dois agentes antifúngicos, com diluições de concentração acima e abaixo das concentrações CIMs, para os fungos testados (CUENCA-ESTRELLA, 2004). Essa técnica é mais frequentemente realizada em microplacas de 96 poços em que cada linha e cada coluna contêm diluições em série duplas das substâncias X e Y, atingindo uma combinação única das duas substâncias em cada poço. Então, um inóculo quantificado do fungo é adicionado a cada poço e a microplaca é incubada a uma temperatura e tempo adequados, para cada fungo. As concentrações dos primeiros poços sem crescimento visível ao longo do limite entre inibição e crescimento, são utilizados para calcular o Índice Fracionário de Concentração Inibitória (IFCI) (ODDS, 2003; SVETAZ et al., 2016).

Embora as diluições utilizadas no tabuleiro de xadrez sejam exponenciais, tipicamente diluições duplas, os resultados são interpretados pelo padrão que eles formam em um isobograma, que exhibe o IFCI em uma escala aritmética. O IFCI é a maneira mais comum na medicina micológica para reportar os resultados dos estudos com diluições de tabuleiro xadrez. É a menor concentração de cada composto que inibe o crescimento do fungo avaliado. Esse índice é calculado pela seguinte fórmula: $(A)/(CIM-A) + (B)/(CIM-B) = IFCI$, sendo 'A' a concentração do composto 'A' no poço que há a menor CIM em combinação; (CIM-A), a CIM

para o composto ‘A’ sozinho. ‘B’, ‘CIM-B’ e ‘CIFB’ são definidos da mesma forma para o segundo composto (CUENCA-ESTRELLA, 2004).

De acordo com Odds (2003), um IFCI $\leq 0,5$ é indicativo de sinergismo; um IFCI > 4 indica antagonismo e um IFCI na faixa entre 0,5 e 4,0 é indicativo de nenhuma interação. No entanto, outros autores consideram outros limites para o IFCI, e também descrevem os resultados usando termos como ‘adição’, ‘sem interação’ e ‘indiferente’ (MARTINEZ-IRUJO et al, 1996; SCHELZ, MOLNAR e HOHMANN, 2006; SVETAZ et al., 2016). A maioria dos especialistas concorda que não há diferença real entre aditividade e indiferença, e afirmam que valores de IFCI ligeiramente acima ou abaixo do valor de corte de 1,0, indicam nenhuma interação entre agentes (ODDS, 2003).

Estudos têm demonstrado o efeito sinérgico entre substâncias naturais e antimicrobianos. De acordo com Hemaiswarya, Kumar e Doble (2008), muitos extratos e compostos isolados de plantas podem exibir atividade sinérgica com antimicrobianos no combate às infecções por bactérias e fungos (AGUIAR, 2014; SVETAZ et al., 2016).

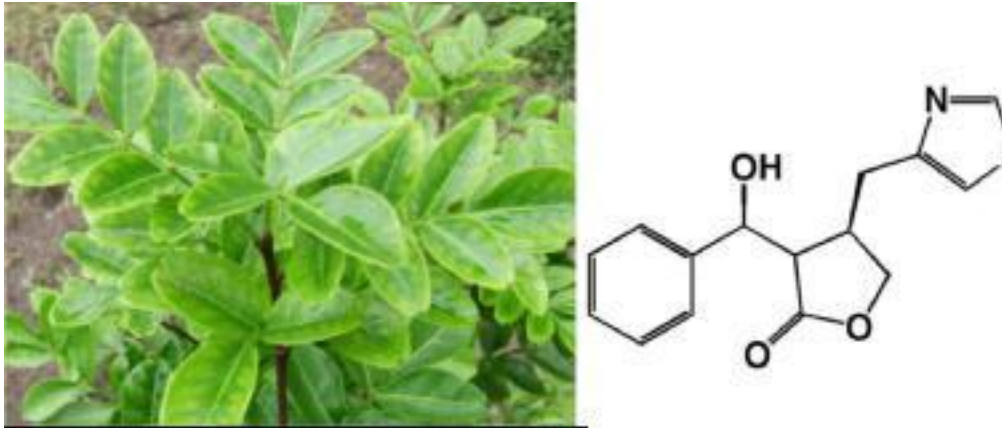
2.6. *Pilocarpus microphyllus*

2.6.1 Alcaloides do jaborandi: generalidades

As investigações de muitas espécies de plantas têm revelado a presença de um grande número de novos compostos pertencentes a diferentes classes (KAYSER, KIDERLEN, CROF 2003; NEWMAN e CRAGG, 2007; VERAS et al., 2012). Dentre estes, pode-se citar os alcalóides, os quais são metabólitos secundários. Eles vêm atraindo a atenção de muitos pesquisadores ao longo dos anos, devido à variedade de estruturas químicas e gama de atividades biológicas (KAYSER, KIDERLEN, CROF 2003; VERAS et al., 2012).

Várias plantas da família Rutaceae são economicamente valiosas devido aos seus usos como alimentos, ornamentais e medicinais. O gênero *Pilocarpus*, o qual pertence a essa família, compreende atualmente 16 espécies neotropicais, sendo a ocorrência da maioria de seus representantes no Brasil (SKORUPA, 2003; SANTOS e MORENO, 2013; VERAS et al., 2012; LIMA, 2016). A espécie *Pilocarpus microphyllus*, conhecida popularmente como ‘jaborandi’ (Figura 2.10), se destaca como uma das mais importantes da flora brasileira, utilizada há séculos pelos indígenas e comunidades tradicionais. Esta planta se apresenta como um arbusto de cerca de 1 metro de altura, de ocorrência nas regiões Nordeste e Norte do Brasil, sendo encontrada no leste do Estado do Pará, oeste e norte do Maranhão e ao norte do Piauí (PINHEIRO, 1997; LIMA, 2008; LIMA et al., 2015; FLORA DO BRASIL, 2016).

Figura 2.10 Exemplar de *Pilocarpus microphyllus*.



Fonte: VERAS et al., 2012

Essa é uma das espécies medicinais brasileiras de maior destaque, constando em farmacopeias de todo o mundo, devido aos efeitos terapêuticos do seu princípio ativo pilocarpina, o qual é utilizado no tratamento do glaucoma e xerostomia (LEWIS e ELVIN-LEWIS, 1977; LIMA et al., 2015). Sendo assim, de grande relevância para as indústrias farmacêuticas e farmoquímicas nacionais e internacionais. Este princípio ativo é extraído, purificado e isolado há décadas da espécie *P. microphyllus* devido a mesma apresentar os maiores teores do ativo em relação as outras espécies do gênero (SANDHU et al., 2006; BRANDAO et al., 2008; LIMA, 2016).

Diante da importância e uso desta espécie, como princípio ativo para o tratamento do glaucoma, a mesma foi explorada durante décadas no Brasil de maneira insustentável, a ponto de atualmente constar na Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (IBAMA, 2008; LIMA, 2016). É de extrema importância iniciativas que agreguem potencial tecnológico e que deem sustentabilidade à espécie, devido à importância para diversas comunidades extrativistas de baixa renda no Norte e Nordeste do Brasil, nos Estados do Piauí, Maranhão e Pará (LIMA, 2016). A extração do jaborandi movimenta uma grande massa de recursos nessas regiões, aproximadamente 229 toneladas, perfazendo cerca de R\$ 920.000,00 de um total de R\$ 4,4 bilhões referentes ao extrativismo vegetal realizado no Brasil no ano de 2016 (IBGE, 2016).

Durante o processo de beneficiamento do jaborandi para a retirada da pilocarpina é gerada uma biomassa contendo outros alcaloides que podem exercer atividade biológica, porém, ainda carecem de estudos mais aprofundados (SANTOS e MORENO, 2004; VERAS et al., 2013; LIMA et al., 2015). A importância do *Pilocarpus microphyllus* vem se concentrando na pesquisa e desenvolvimento da aplicação farmacológica e biotecnológica desses outros alcaloides. Dentre estes, citam-se: isopilocarpina, pilocarpidina, isopilocarpidina, pilosina,

isopilosina, epiisopilosina e epiisopiloturina (SANTOS E MORENO, 2004; VERAS et al., 2013). Apesar da grande variedade de estruturas químicas descritas para o gênero, apenas a pilocarpina é utilizada na terapêutica atual. O potencial biológico de alguns desses alcaloides foi reportado recentemente. Rocha et al. (2017) analisaram o potencial antibacteriano e anti-helmíntico da pilosina, epiisopilosina, epiisopiloturina e macaubina. Dentre estes, apenas a epiisopilosina e isopilosina mostraram potencial atividade anti-helmíntica e nenhum deles apresentou atividade antibacteriana.

Os alcaloides encontrados no jaborandi possuem estruturas químicas semelhantes aos fármacos antifúngicos imidazólicos (SANDE et al., 1987; MIURA, 2009; SUN, HUANG e LIU, 2017). Porém, apesar dessa similaridade, apenas um trabalho realizou a avaliação da susceptibilidade de isolados antifúngicos frente à epiisopiloturina (CARVALHO et al., 2018, no prelo).

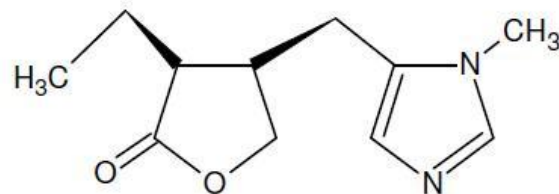
2.6.2 Pilocarpina

A pilocarpina (Figura 2.11) foi primeiramente isolada em 1875, como sal cristalino a partir da folha do *Pilocarpus jaborandi* Holmes. Esse alcaloide é encontrado também em outras espécies, tais como *P. microphyllus* Stapf., *P. pennatifolius* Lemmaire, *P. racemosus* Vahl., *P. trachyllophus* Holmes e *P. carajaensis* Skorupa. O total de pilocarpina dessas espécies varia de 3 a 70% dos alcaloides totais, sendo esta considerada um protótipo dentre os compostos oriundos do jaborandi, visto que é a substância em maior concentração nas folhas da planta (MAAT e BEYERMAN, 1984; DEWICK, 1997; MIURA, 2009; SANTOS e MORENO, 2013).

Trata-se de um alcalóide com estrutura de uma amina terciária. Esse alcaloide tem estrutura semelhante aos outros alcaloides isolados da espécie *Pilocarpus microphyllus* (SANTOS e MORENO, 2004; MIURA, 2009). Das folhas dessa planta são processados os sais cloridrato de pilocarpina, nitrato de pilocarpina, além de sua forma livre (pilocarpina base) (TSAI et al., 2003; NORDSTROM et al., 2005; LIMA, 2008). Esse alcaloide é capaz de ativar o sistema nervoso autônomo parassimpático, atuando como agonista de receptor muscarínico não seletivo, sendo amplamente utilizado no tratamento de glaucoma, há mais de 140 anos, e em casos de xerostomia. Ao contrário de outras substâncias que visam o controle do glaucoma, a pilocarpina topicamente não apresenta efeitos colaterais significativos (TAYLOR e AL-HASHIMI, 1996; SABÁ et al., 2002; MIURA, 2009). O uso de pilocarpina oral para o tratamento de secura severa de olhos em pacientes com síndrome de Sjogren é relatado na clínica (TSIFETAKI et al., 2003; KAWAKITA; SHIMMURA e TSUBOTA, 2015). Por ser

uma substância estimuladora de receptores colinérgicos, a pilocarpina apresenta outras ações, tais como: estimulantes de glândulas secretoras, relaxamento de esfíncteres e estimulante da peristalse. Devido ao estímulo glândulas sudoríparas termorreguladoras, lacrimais e nasofaríngeas, está sendo também indicada em pacientes submetidos a quimioterapia, principalmente para os acometidos com câncer de boca e pescoço (HAMLAR et al., 1996; WYNN, 1996; PAPPANO, 2006; MIURA, 2009). Possui efeitos discretos no coração e músculo liso gastrointestinal (VALDEZ et al., 1993; MIURA, 2009; LAI e LUO 2015; MELO et al., 2015; FRANCO, SCHIMPL E MAZZAFERA, 2017).

Figura 2.11 Estrutura química da pilocarpina.



Fonte: MIURA, 2009.

Apesar das aplicações clássicas desse alcaloide, pouco se sabe sobre o seu potencial antimicrobiano. Rhodus e colaboradores (1998) relataram um decréscimo no número de colônias de *Candida albicans* em pacientes com Síndrome de Sjögren. Um outro estudo, mostrou que a pilocarpina teve atividade sinérgica quando usado com aminoglicosídeos (gentamicina e neomicina) contra *Staphylococcus aureus*, porém a mesma não apresentou atividade sinérgica quando usada em combinação com a anfotericina B contra *Candida albicans* (ARARUNA, et al., 2012).

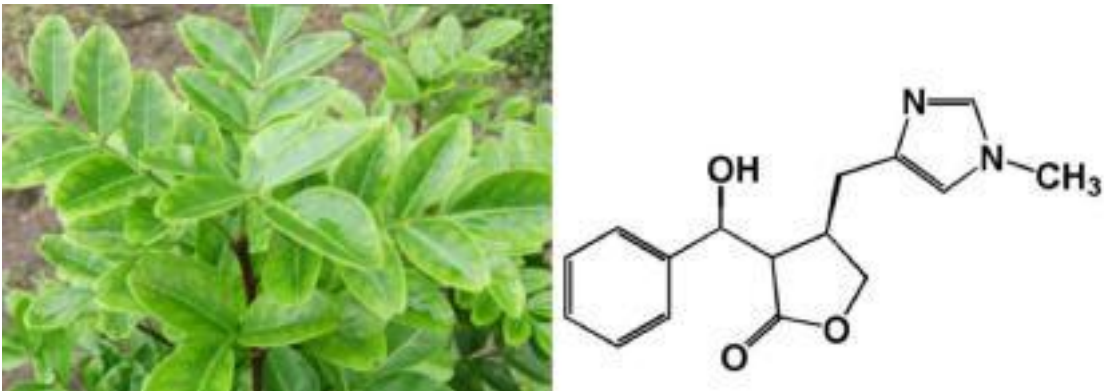
2.6.3 Epiisopiloturina

O processo de extração e isolamento da pilocarpina culmina na geração de uma grande quantidade de resíduos, rica em outras diversas moléculas que apresentam potencial ação terapêutica. Dentre essas moléculas, o alcaloide mais abundante é a epiisopiloturina, a qual tem atraído a atenção da comunidade científica (SANTOS e MORENO, 2004; VERAS et al., 2013; MELO et al., 2015).

Esta foi identificada por Voightlander e colaboradores em 1973 (VOIGTLANDER et al., 1973). A estrutura química da epiisopiloturina (Figura 2.12) difere da pilocarpina pela presença de um grupamento hidrobencílico ao invés de um etílico, e assemelha-se à ela por sua

estrutura formada de um anel imidazólico ligado a um ciclopentano heterocíclico. A similaridade entre as estruturas destes dois compostos torna a epiisopiloturina um alcalóide promissor quanto a propriedades biologicamente ativas. Além do mais, a epiisopiloturina pode ser obtida em larga escala, por processos sustentáveis e econômicos (VERAS et al., 2012, 2013).

Figura 2.12. Estrutura química da epiisopiloturina.



Fonte: VERAS et al., 2012.

As propriedades biológicas desse alcaloide vêm sendo investigadas. Este demonstrou atividades tanto *in vivo* quanto *in vitro* contra o *Schistosoma mansoni*, o principal agente causador da esquistossomose, uma doença negligenciada que ocorre em populações pobres de áreas rurais. A atividade contra *Leishmania amazonensis* também foi relatada (MIURA, 2009; LEITE et al., 2011; VERAS et al., 2012; VERAS et al., 2013). SILVA et al. (2013) avaliaram este alcaloide quanto às atividades anti-inflamatória e antinociceptiva *in vivo*.

Veras e colaboradores (2012) avaliaram o efeito *in vitro* deste alcaloide no tempo de sobrevivência de *Schistosoma mansoni* de diferentes idades, em esquistossômulos de 3 h de idade e 1, 3, 5 e 7 dias de idade, adultos de 49 dias e na postura de ovos. A epiisopiloturina, na concentração de 300 µg/mL, causou a morte de todos os esquistossômulos dentro de 120 h. Alterações tegumentárias extensas e morte foram observadas quando os esquistossomos adultos foram expostos a 150 µg/mL da epiisopiloturina. Com a maior dose sub-letal desse alcalóide (100 µg/mL), observou-se uma redução de 100% na postura de ovos (VERAS et al., 2012). Guimarães et al. (2015) reportaram atividade anti-helmíntica *in vivo* para tal composto. A atividade *in vitro* de lipossomas carregados com epiisopiloturina também mostrou atividade contra a esquistossomose (GUIMARÃES et al., 2015). A epiisopiloturina também mostrou potente atividade anti-inflamatória, o que poderia ajudar a combater reações inflamatórias, bem

como granulomas (SILVA et al., 2013). Mais recentemente, um estudo avaliou a atividade antibacteriana da epiisopiloturina, onde esse composto não apresentou nenhuma atividade nas cepas bacterianas testadas (ROCHA et al., 2017). Em relação ao seu potencial antifúngico, um estudo desenvolvido anteriormente por nosso grupo de pesquisa reportou, através de um ensaio de prospecção, a ausência de atividade nos isolados fúngicos testados. Esse resultado foi associado à possível incapacidade desse alcaloide de se ligar à lanosterol 14 α -demetilase (CARVALHO et al., 2018, no prelo), um dos principais alvos dos antifúngicos clássicos. Apesar desses resultados, a possibilidade desse alcaloide agir em outro alvo na célula fúngica não pode ser excluída. Até o momento nenhum estudo foi feito para avaliar o potencial sinérgico desse composto em associação com antifúngicos.

Tendo em vista o potencial biológico dos alcaloides obtidos a partir das folhas *P. microphyllus*, uma investigação mais aprofundada com relação aos efeitos sobre os fungos patogênicos deve ser realizada.

2.7.Referências

- ABDULLA, K.A.; SAEED, R.R. What is deep tropical mycosis? An underestimated entity with serious problems. **International Journal of Advances in Medicine**, v. 2, n. 2, p. 76-82, 2015.
- AGARWAL, R. et al. Chromoblastomycosis in India: Review of 169 cases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 8, p. e0005534, 2017.
- AGUIAR, F.J.S. **Efeito Sinérgico do Ácido Úsnico e Agentes Antimicrobianos Frente a *Staphylococcus aureus* Multirresistentes**. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Pós-Graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. 2014.
- AHSAN, S. M.; RAO, C. M. Condition responsive nanoparticles for managing infection and inflammation in keratitis. **Nanoscale**, v. 9, n. 28, p. 9946-9959, 2017.
- AL-DOORY Y. **Chromomycosis**. In Di Salvo AF (ed), Occupational mycoses. Lea & Febiger, Philadelphia, PA. p 95–121, 1983.
- ANSARI, Z.; MILLER, D.; GALOR, A. Current thoughts in fungal keratitis: diagnosis and treatment. **Current Fungal Infection Reports**, v. 7, n. 3, p. 209-218, 2013.
- ANTONELLO, V.S. et al. Treatment of severe chromoblastomycosis with itraconazole and 5-flucytosine association. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 52, n. 6, p. 329-331, 2010.
- ARARUNA, M.K.A et al. Evaluation of antibiotic & antibiotic modifying activity of pilocarpine & rutin. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 135, n. 2, p. 252, 2012.
- ASSIS, P.A. de. **Atividade antifúngica de extratos depositados no banco de extratos de plantas do Bioma Cerrado e de substâncias isoladas de *Matayba Guianensis***. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília, 168 p 2013.

AUSTIN, A.; LIETMAN, T.; ROSE-NUSSBAUMER, J. Update on the Management of Infectious Keratitis. **Ophthalmology**, v. 124, n. 11, p. 1678-1689, 2017.

BARANYI N, et al. Keratitis caused by *Aspergillus pseudotamarii*. **Medical mycology case reports**. V. 12, p. 91-4, 2013.

BONIFAZ, A. et al. Treatment of chromoblastomycosis with terbinafine: experience with four cases. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 16, n. 1, p. 47-51, 2005.

BONIFAZ, A.; CARRASCO-GERARD, E.; SAUL, A. Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. **Mycoses**, v. 44, n. 1-2, p. 1-7, 2001.

BONIFAZ, A.; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, D.; PERUSQUÍA-ORTIZ, A. M. Subcutaneous mycoses: chromoblastomycosis, sporotrichosis and mycetoma. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 8, n. 8, p. 619-628, 2010.

BORELLI, D. A clinical trial of itraconazole in the treatment of deep mycoses and leishmaniasis. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 9, n. Supplement 1, p. S57-S63, 1987.

BOURCIER, T. et al. Kératites fongiques. **Journal francais d'ophtalmologie**, v.40, e307, 2017.

BRANDÃO, M.G.L et al. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 141-148, 2008.

BROWN, G.D. et al. Hidden killers: human fungal infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, p. 165rv13-165rv13, 2012.

CAMPITELLI, M. et al. Combination Antifungal Therapy: A Review of Current Data. **Journal of Clinical Medicine Research**, v. 9, n. 6, p. 451, 2017.

CARIELLO, A. J. et al. Microbial keratitis at a referral center in Brazil. **International Ophthalmology**, v. 31, n. 3, p. 197, 2011.

CARRILLO-MUÑOZ, A.X. et al. Combination antifungal therapy: A strategy for the management of invasive fungal infections. **Revista Espanola De Quimioterapia**. v. 27, n. 3, p. 141-158, 2014.

CARRIÓN, A.L. Chromoblastomycosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 50, n. 1, p. 1255-1282, 1950.

CARVALHO, A.M.A et al. Epiisopiloturine, an imidazole alkaloid: *in vitro* antifungal activity and molecular Docking. 2018. No prelo.

CARVALHO, M.H.G.F. de. "**Determinação da susceptibilidade aos fármacos antifúngicos de amostras do complexo de espécies de *Candida parapsilosis* isoladas de pacientes com fungemia.**" Dissertação (Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) - Fundação Oswaldo Cruz. Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Rio de Janeiro, 2012.

CASTRO, R.M.; CASTRO, L.G.M. On the Priority of Description of Chromomycosis./Zur Priorität der Beschreibung der Chromomykose. **Mycoses**, v. 30, n. 9, p. 397-403, 1987.

CHEN, S. C. et al. Consensus guidelines for the treatment of yeast infections in the haematology, oncology and intensive care setting. **Internal Medicine Journal**, v. 44, n. 12b, p. 1315-1332, 2014.

CHIDAMBARAM, J.D. et al. *In vivo* confocal microscopy appearance of *Fusarium* and *Aspergillus* species in fungal keratitis. **British Journal of Ophthalmology**, p. bjophthalmol-2016-309656, 2017.

CHOWDHARY, A. et al. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of systemic phaeohyphomycosis: diseases caused by black fungi. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, p. 47-75, 2014.

CHOWDHARY, A.; SINGH, K. Spectrum of fungal keratitis in North India. **Cornea**, v. 24, n. 1, p. 8-15, 2005.

CLSI. Reference Method for broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi Approved Standard – Second Edition. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. (a)

CLSI. Reference Method for broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Third Edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. (b)

COSTA, J. L. P. et al. Keratitis by *Aspergillus flavus* infection after cataract surgery. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 75, n. 6, p. 473-475, 2016.

COSTA, J.M.L. et al. Estágio atual da leishmaniose cutânea difusa (LCD) no estado do Maranhão. I. Relato preliminar. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 24, p.59-60, 1991.

CUENCA-ESTRELLA, M.. Combinations of antifungal agents in therapy—what value are they?. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 5, p. 854-869, 2004.

DABOIT, T.C. et al. A case of *Exophiala spinifera* infection in Southern Brazil: molecular identification and antifungal susceptibility. **Medical Mycology Case Reports**, n.1 72-75, 2012.

DABOIT, T.C. **Nanoemulsões de afontericina B e itraconazol: Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* em agentes da cromoblastomicose.** Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 225p. 2013.

DABOIT, T.C. et al. *In vitro* susceptibility of chromoblastomycosis agents to five antifungal drugs and to the combination of terbinafine and amphotericin B. **Mycoses**, v. 57, n. 2, p. 116-120, 2014.

DAWSON, A.L.; DELLAVALLE, R. P.; ELSTON, D. M. Infectious skin diseases: a review and needs assessment. **Dermatologic Clinics**, v. 30, n. 1, p. 141-151, 2012.

DE AZEVEDO, C.M.P.S et al. *Fonsecaea pugnacius*, a novel agent of disseminated chromoblastomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 8, p. 2674-2685, 2015.

DE HOOG, G.S. Evolution of black yeasts: possible adaptation to the human host. **Antonie Van Leeuwenhoek** v. 63, p.105–109, 1993.

DE HOOG, G.S., et al. "Atlas of clinical fungi, Centraalbureau voor Schimmelcultures." **Universitat Rovira i Virgili**. 2000.

DE KRUIJFF, B.; DEMEL, R.A. Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. III. Molecular structure of the polyene

- antibiotic-cholesterol complexes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 339, n. 1, p. 57-70, 1974.
- DEWICK P.M. Medicinal Natural Products – A Biosynthetic Approach. **New Phytologist**. Chichester: John Wiley & Sons, V. 140, p.763–772, 2008.
- DIGNANI, M.C. Epidemiology of invasive fungal diseases on the basis of autopsy reports. **F1000_prime reports**, v. 6, 2014.
- EPSTEIN, A.B. In the aftermath of the *Fusarium* keratitis outbreak: What have we learned?. **Clinical Ophthalmology (Auckland, NZ)**, v. 1, n. 4, p. 355, 2007.
- ERDEM, E. et al. *Aspergillus flavus* Keratitis: Experience of a Tertiary Eye Clinic in Turkey. **Mycopathologia**, v. 182, n. 3-4, p. 379-385, 2017.
- ERIE, J.C. et al. Incidence of ulcerative keratitis in a defined population from 1950 through 1988. **Archives of Ophthalmology**, v. 111, n. 12, p. 1665-1671, 1993
- ESTERRE, P. et al. Treatment of chromomycosis with terbinafine: preliminary results of an open pilot study. **British Journal of Dermatology**, v. 134, n. s46, p. 33-36, 1996.
- ESTERRE P, QUEIROZ-TELLES F. Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. **Curr Opin Infect Dis** v.19, p. 148–152, 2006.
- FISHER, M.C. et al. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. **Nature**, v. 484, n. 7393, p. 186, 2012.
- FISHMAN, J.A. Summary: future directions in antifungal therapy. **Transplant Infectious Disease**, v. 4, n. s3, p. 67-68, 2002.
- FLORA DO BRASIL, Rutaceae 2020 em construção. Brasil: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB866>. Acesso em 13 April. 2018.
- FRANCO, M.C.; SCHIMPL, F.C; MAZZAFERA, P. Reference genes for quantitative RT-PCR of the pilocarpine producer *Pilocarpus microphyllus* and two other *Pilocarpus* species. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 29, n. 1, p. 51-59, 2017.
- FUENTEFRIA, A. M. et al. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. **Letters in Applied Microbiology**, 2017.
- FURLANETTO, R. L. et al. Epidemiology and etiologic diagnosis of infectious keratitis in Uberlandia, Brazil. **European Journal of Ophthalmology**, v. 20, n. 3, p. 498-503, 2010.
- GARBEE, D.D.; PIERCE, S.S.; MANNING, J. Opportunistic fungal infections in critical care units. **Critical Care Nursing Clinics**, v. 29, n. 1, p. 67-79, 2017.
- GARNICA, M.; NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F. Difficult mycoses of the skin: advances in the epidemiology and management of eumycetoma, phaeohyphomycosis and chromoblastomycosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 22, n. 6, p. 559-563, 2009.
- GHANNOUM, M.A., e RICE, L.B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n.4, p. 501-517, 1999.

GHOSH, A.K. et al. Fungal keratitis in North India: Spectrum of agents, risk factors and treatment. **Mycopathologia**, v. 181, n. 11-12, p. 843-850, 2016.

GOMES, R.R. et al. Molecular epidemiology of agents of human chromoblastomycosis in Brazil with the description of two novel species. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 11, p. e0005102, 2016.

GOPINATHAN, U. et al. Review of epidemiological features, microbiological diagnosis and treatment outcome of microbial keratitis: experience of over a decade. **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 57, n. 4, p. 273, 2009.

GOPINATHAN, U. et al. The epidemiological features and laboratory results of fungal keratitis: a 10-year review at a referral eye care center in South India. **Cornea**, v. 21, n. 6, p. 555-559, 2002.

GRANT, S.M.; CLISSOLD, S.P. Itraconazole. **Drugs**, v. 37, n. 3, p. 310-344, 1989.

GUIMARÃES, M.A. et al. Anthelmintic activity *in vivo* of epiisopiloturine against juvenile and adult worms of *Schistosoma mansoni*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, p. e0003656, 2015.

HAMLAR, D. D. et al. Determination of the efficacy of topical oral pilocarpine for postirradiation xerostomia in patients with head and neck carcinoma. **The Laryngoscope**, v. 106, n. 8, p. 972-976, 1996.

HAY R.J. **Fungal infections**. Manson's tropical diseases. 22nd edition. Philadelphia: WB Saunders. V.71, p. 1169-89, 2008.

HE, D. et al. Etiological analysis of fungal keratitis and rapid identification of predominant fungal pathogens. **Mycopathologia**, v. 181, n. 1-2, p. 75-82, 2016.

HEDAYATI, M. T. et al. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Microbiology**, v. 153, n. 6, p. 1677-1692, 2007.

HERNANDEZ-HERNANDEZ, F. et al. Sex hormone effects on *Phialophora verrucosa* *in vitro* and characterization of progesterone receptors. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 33, n. 4, p. 235-239, 1995.

HOLZ, R.W. The effects of the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B on thin lipid membranes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 235, n. 1, p. 469-479, 1974.

HOSTETTER, M. K. Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, n. 1, p. 29-42, 1994.

IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). Instrução Normativa do Ministério do Meio Ambiente (MMA) n°06, de 26 de setembro de 2008. Estabelece a Lista Oficial de Espécies Brasileiras Ameaçadas de Extinção.

IBGE. Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura – PEVS. 2016. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/2040-np->

producao-da-extracao-vegetal-e-da-silvicultura/9105-.html?edicao=18028&t=downloads
Acesso em 13 de Abril de 2018

IBRAHIM, M. M. et al. A new method to predict the epidemiology of fungal keratitis by monitoring the sales distribution of antifungal eye drops in Brazil. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33775, 2012.

IBRAHIM, Marlon Moraes et al. Epidemiologic aspects and clinical outcome of fungal keratitis in southeastern Brazil. **European journal of ophthalmology**, v. 19, n. 3, p. 355-361, 2009.

JAFARINASAB, M-R. et al. *Aspergillus flavus* keratitis after deep anterior lamellar keratoplasty. **Journal of Ophthalmic & Vision Research**, v. 7, n. 2, p. 167, 2012.

JAIN, V. et al. *Aspergillus*-induced malignant glaucoma. **Cornea**, v. 26, n. 6, p. 762-763, 2007.

JUNG, D.S.; TVERDEK, F.P.; KONTOYIANNIS, D.P. Switching from posaconazole suspension to tablets increases serum drug levels in leukemia patients without clinically relevant hepatotoxicity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 11, p. 6993-6995, 2014.

KARTHIKEYAN, R. S. et al. Expression of innate and adaptive immune mediators in human corneal tissue infected with *Aspergillus* or *fusarium*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 6, p. 942-950, 2011.

KAWAKITA, T.; SHIMMURA, S.; TSUBOTA, K. Effect of oral pilocarpine in treating severe dry eye in patients with Sjögren syndrome. **The Asia-Pacific Journal of Ophthalmology**, v. 4, n. 2, p. 101-105, 2015.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F.; CROFT, S. L. Natural products as antiparasitic drugs. **Parasitology Research**, v. 90, n. 2, p. S55-S62, 2003.

KEAY, L. J. et al. Clinical and microbiological characteristics of fungal keratitis in the United States, 2001–2007: a multicenter study. **Ophthalmology**, v. 118, n. 5, p. 920-926, 2011.

KERRIDGE, D. The protoplast membrane and antifungal drugs. **Fungal Protoplasts: Applications in Biochemistry and Genetics**. Marcel Dekker Inc., New York, NY, p. 135, 1985.

KOMPELLA, U.B.; KADAM, R.S.; LEE, V.H.L. Recent advances in ophthalmic drug delivery. **Therapeutic Delivery**, v. 1, n. 3, p. 435-456, 2010.

KRAFT, W.K. et al. Posaconazole tablet pharmacokinetics: lack of effect of concomitant medications altering gastric pH and gastric motility in healthy subjects. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 7, p. 4020-4025, 2014.

KREDICS, L. et al. Filamentous fungal infections of the cornea: a global overview of epidemiology and drug sensitivity. **Mycoses**, v. 58, n. 4, p. 243-260, 2015.

KRZYŚCIAK, P.M.; PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA, M.; PIASZCZYŃSKI, M.. Chromoblastomycosis. **Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii**, v. 31, n. 5, p. 310, 2014.

KUMARASINGHE, S. P.; KUMARASINGHE, M. P. Itraconazole pulse therapy in chromoblastomycosis. **European Journal of Dermatology: EJD**, v. 10, n. 3, p. 220-222, 2000.

- KURIAKOSE, T. et al. Keratomycotic malignant glaucoma. **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 39, n. 3, p. 118, 1991.
- LAI, J-Y; LUO, L-J. Antioxidant gallic acid-functionalized biodegradable in situ gelling copolymers for cytoprotective antiglaucoma drug delivery systems. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 9, p. 2950-2963, 2015.
- LAKHUNDI, S.; SIDDIQUI, R.; KHAN, N. A. Pathogenesis of microbial keratitis. **Microbial Pathogenesis**, v. 104, p. 97-109, 2017.
- LALITHA, P. et al. Antimicrobial susceptibility of *Fusarium*, *Aspergillus*, and other filamentous fungi isolated from keratitis. **Archives of Ophthalmology**, v. 125, n. 6, p. 789-793, 2007.
- LANGFELDER, K. et al. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 38, n. 2, p. 143-158, 2003.
- LECK, A.K. et al. Aetiology of suppurative corneal ulcers in Ghana and south India, and epidemiology of fungal keratitis. **British Journal of Ophthalmology**, v. 86, n. 11, p. 1211-1215, 2002.
- LEITE, J.R.S.A. et al. Processo de obtenção da epiisopiloturina e sua aplicação no combate à infecções parasitárias. **BR PI0904110-9**, 2011.
- LEWIS, W.H.; ELVIN-LEWIS, M.P.F. **Medical Botany - Plants Affecting man's health**. New York: John Wiley & Sons, 1977.
- LEYDEN, J. Pharmacokinetics and pharmacology of terbinafine and itraconazole. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 38, n. 5, p. S42-S47, 1998.
- LIANG, Qing-feng et al. Effect of topical application of terbinafine on fungal keratitis. **Chinese Medical Journal**, v. 122, n. 16, p. 1884-1888, 2009.
- LIMA, D. F. **Alcalóides de interesse industrial: aspectos químicos e biológicos**. Monografia (Especialização em Plantas Medicinais)–Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 56f, 2008.
- LIMA, D. F. et al. Prospecção tecnológica do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*): espécie economicamente importante no norte e nordeste do Brasil. **Revista GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 5, n. 1, p. 1626-1638, 2015.
- LIMA, D. F. **Prospecção tecnológica, perfil químico sazonal de alcalóides imidazólicos, aspectos polimórficos moleculares e morfológicos de *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth (jaborandi)**. Tese. (Doutorado em Biotecnologia) – RENORBIO. 2016.
- LUPETTI, A. et al. Molecular targeted treatments for fungal infections: the role of drug combinations. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 6, p. 269-276, 2003.
- LUPI O. et al. Tropical dermatology: fungal tropical diseases. **J Am Acad Dermatol** V. 53, p. 931-951, 2005.

MAAT L, B.H.C. The Imidazole Alkaloids In: Brossi A (ed) **The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology**, vol. 22. Academic Press, New York. 1984.

- MANIKANDAN, P. et al. *Aspergillus* species in human keratomycosis. ***Aspergillus in the genomic era***, p. 293-328, 2008.
- MANIKANDAN, P. et al. Epidemiology of *Aspergillus* keratitis at a tertiary care eye hospital in South India and antifungal susceptibilities of the causative agents. ***Mycoses***, v. 56, n. 1, p. 26-33, 2013.
- MARANGON, F. B. et al. *In vitro* investigation of voriconazole susceptibility for keratitis and endophthalmitis fungal pathogens. ***American Journal of Ophthalmology***, v. 137, n. 5, p. 820-825, 2004.
- MARQUES, S.G. et al. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the shell of the babassu coconut (*Orbignya phalerata* Martius) in the Amazon region of Maranhão Brazil. ***Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi***, v. 47, n. 4, p. 305-311, 2006.
- MARTÍNEZ, R. L.; TOVAR, L. J. M.. Chromoblastomycosis. ***Clinics in Dermatology***, v. 25, n. 2, p. 188-194, 2007.
- MARTINEZ-IRUJO, J. J. et al. A checkerboard method to evaluate interactions between drugs. ***Biochemical Pharmacology***, v. 51, n. 5, p. 635-644, 1996.
- MARUJO, F. I. et al. Distribuição das ceratites infecciosas em hospital terciário no Brasil. ***Arquivos Brasileiros de Oftalmologia***, 2013.
- MCGINNIS, M. R.; PASARELL, L. *In vitro* evaluation of terbinafine and itraconazole against dematiaceous fungi. ***Medical Mycology***, v. 36, n. 4, p. 243-246, 1998.
- MCGINNIS, M.R. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis, and mycology. ***Journal of the American Academy of Dermatology***, v. 8, n. 1, p. 1-16, 1983.
- MELLO, E.S.A. et al. *Fonsecaea pedrosoi*- caused chromoblastomycosis in the state of Maranhão. ***Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical***, v. 25, n. 1, p. 37-44, 1992.
- MELO, C. et al. A compatibility study of the prototype epiisopiloturine and pharmaceutical excipients aiming at the attainment of solid pharmaceutical forms. ***Journal of Thermal Analysis & Calorimetry***, v. 120, n. 1, 2015.
- MINOTTO, R. et al. Chromoblastomycosis: a review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. ***Journal of the American Academy of Dermatology***, v. 44, n. 4, p. 585-592, 2001.
- MIURA, L. M. C. V. **Isolamento do alcalóide epiisopiloturina a partir da biomassa do Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) e avaliação de suas atividades antibacteriana, antileishmania, antiviral, antiesquistosoma e sialagoga**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal). Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, p. 123, 2009.
- MOUCHALOUAT, M. de F., et al. Chromoblastomycosis: a clinical and molecular study of 18 cases in Rio de Janeiro, Brazil. ***International Journal of Dermatology*** v. 50, n.8, p. 981-986, 2011.
- MUKHERJEE, P.K. et al. Characterization of *Fusarium* keratitis outbreak isolates: contribution of biofilms to antimicrobial resistance and pathogenesis. ***Investigative Ophthalmology & Visual Science***, v. 53, n. 8, p. 4450-4457, 2012.

MURTAZA, G.; MUKHTAR, M.; SARFRAZ, A. A review: Antifungal potentials of medicinal plants. **Journal of Bioresource Management**, v. 2, n. 2, p. 4, 2015.

NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

NEGRONI, R. et al. Posaconazole treatment of refractory eumycetoma and chromoblastomycosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 6, p. 339-346, 2005.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

NORDSTROM, B.L. et al. Persistence and adherence with topical glaucoma therapy. **American Journal of Ophthalmology**, v. 140, n. 4, p. 598. e1-598. e11, 2005.

NOSANCHUK, J.D.; CASADEVALL, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. **Cellular Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 203-223, 2003.

ODDS, F. C. et al. Nomenclature of fungal diseases: a report and recommendations from a Sub-Committee of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM). **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 30, n. 1, p. 1-10, 1992.

ODDS, Frank C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 1-1, 2003.

OECHSLER, R. A. et al. *Fusarium* keratitis in Brazil: genotyping, *in vitro* susceptibilities, and clinical outcomes. **Clinical Ophthalmology (Auckland, NZ)**, v. 7, p. 1693, 2013.

OGAWA, M.M. et al. Lymphoscintigraphic analysis in chromoblastomycosis. **International Journal of Dermatology**, v. 42, n. 8, p. 622-625, 2003.

OLIVEIRA, D.S. **Interação Medicamentosa : parte II**. Caderno de Farmácia, v. 2, n. 2, p. 97– 110, 1986.

ORMEROD, L. D. et al. Epidemiology of microbial keratitis in southern California: a multivariate analysis. **Ophthalmology**, v. 94, n. 10, p. 1322-1333, 1987.

PANDA, A.; SHARMA, N.; ANGRA, S. K. Topical fluconazole therapy of *Candida* keratitis. **Cornea**, v. 15, n. 4, p. 373-375, 1996.

PAPPANO, A.J. **Drogas ativadoras dos receptores colinérgicos e inibidores da colinesterase**. In: KATZUNG, B.G. Farmacologia Básica e Clínica. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kppgan, p. 79-90, 2006.

PASCOLINI, D; MARIOTTI, A. P. Global estimates of visual impairment. **British Journal of Ophthalmology**, v. 96, n. 5, p. 614-8, 2012.

PEDROSO, A. **Sôbre quatro casos de dermatite verrucosa produzida pela *Phialophora verrucosa***. 1920.

PETRANYI, G.; MEINGASSNER, J.G.; MIETH, H. Activity of terbinafine in experimental fungal infections of laboratory animals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 31, n. 10, p. 1558-1561, 1987.

- PINHEIRO, C.U. Jaborandi (*Pilocarpus* sp., rutaceae): a wild species. **Economic Botany**, v. 51, n. 1, p. 49-58, 1997.
- PIRES, C.A.A. et al. Clinical, epidemiological and mycological report on 65 patients from the Eastern Amazon region with chromoblastomycosis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 87, n. 4, p. 555-560, 2012.
- PORTO, D. J. **Ocorrência de cromoblastomicose em pacientes submetidos a exames micológicos no Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM) em Porto Velho**. Rondônia, Brasil. 2016.
- PRAJNA, N. V. et al. Predictors of outcome in fungal keratitis. **Eye**, v. 26, n. 9, p. 1226, 2012.
- PRAJNA, V. N.; PRAJNA, L.; MUTHIAH, S. Fungal keratitis: The Aravind experience. **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 65, n. 10, p. 912, 2017.
- PURIM, K.S.M. et al. Chromoblastomycosis: tissue modifications during itraconazole treatment. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 92, n. 4, p. 478-483, 2017.
- QUÉDRAOGO, M.S. et al. Chromomycosis acquired in a non-tropical area: A case report. In: **Annales de Dermatologie et de Venereologie**. p. 438-442, 2017.
- QUEIROZ-TELLES F. et al. Itraconazole in the treatment of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*. **International Journal of Dermatology**. V.31, p.805–812, 1992.
- QUEIROZ-TELLES, F. et al. Mycoses of implantation in Latin America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Medical mycology**, v. 49, n. 3, p. 225-236, 2011.
- QUEIROZ-TELLES, F. Chromoblastomycosis: a neglected tropical disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, p. 46-50, 2015.
- QUEIROZ-TELLES, F. et al. Chromoblastomycosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 1, p. 233-276, 2017 (b).
- QUEIROZ-TELLES, F. et al. Neglected endemic mycoses. **The Lancet Infectious Diseases**, 2017 (a).
- QUEIROZ-TELLES, F.; DE CL SANTOS, D. W. Challenges in the therapy of chromoblastomycosis. **Mycopathologia**, v. 175, n. 5-6, p. 477-488, 2013.
- QUEIROZ-TELLES, Flavio. Chromoblastomycosis: a neglected tropical disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, p. 46-50, 2015.
- RASAMOELINA, T., et al. Chromoblastomycosis and sporotrichosis, two endemic but neglected fungal infections in Madagascar. **Journal de Mycologie Medicale**. V.27, n.3, p. 312-324, 2017.
- REFOJO, N. et al. Keratitis caused by moulds in Santa Lucía Ophthalmology Hospital in Buenos Aires, Argentina. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 33, n. 1, p. 1-6, 2016.

REVANKAR S.G, SUTTON D.A. Melanized fungi in human disease. **Clinical Microbiologu Reviews**. V.23, p. 884 –928. 2010.

- RHODUS, N. L. et al. *Candida albicans* levels in patients with Sjögren's syndrome before and after long-term use of pilocarpine hydrochloride: A pilot study. **Quintessence international**, v. 29, n. 11, 1998
- RIBEIRO, E. L. et al. Cromoblastomicose: doença presente na realidade populacional brasileira. **RBAC**, v. 38, n. 3, p. 189-192, 2006.
- RIPPON J.W. **Chromoblastomycosis and related dermal infections caused by dematiaceous fungi. In: Medical Mycology.** The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes. 2nd ed. JW Rippon, Philadelphia: WB Saunders; p. 249-76, 1982.
- RIVITTI, E.A.; AOKI, V.. Deep fungal infections in tropical countries. **Clinics in Dermatology**, v. 17, n. 2, p. 171-190, 1999.
- ROCHA, J.A. et al. Anthelmintic, Antibacterial and Cytotoxicity Activity of Imidazole Alkaloids from *Pilocarpus microphyllus* Leaves. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 4, p. 624-630, 2017.
- ROSA, R. H.; MILLER, D.; ALFONSO, E. C. The changing spectrum of fungal keratitis in south Florida. **Ophthalmology**, v. 101, n. 6, p. 1005-1013, 1994.
- ROY, A. A Review on the Alkaloids an Important Therapeutic Compound from Plants. **Institut Jean-Pierre Bourgin** v. 1, p. 9, 2017. (a)
- ROY, P. et al. Changing trends in fungal and bacterial profile of infectious keratitis at a tertiary care hospital: A six-year study. **Clinical Epidemiology and Global Health** v.5, n.1, p. 40-45, 2017. (b)
- RUDOLPH, M. et al. On Brazilian Figueira. **Archiv fur Schiffs-und Tropenhygiene**, v. 18, n. 14, 1914.
- RYDER, N. S.; WAGNER, S.; LEITNER, I. *In vitro* activities of terbinafine against cutaneous isolates of *Candida albicans* and other pathogenic yeasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 5, p. 1057-1061, 1998.
- SABÁ, R. T. et al. Micropropagation of the jaborandi. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 106-109, 2002.
- SALGADO C.G. Fungal x host interactions in chromoblastomycosis. **Virulence** v.1, p.3-5, 2010.
- SANDE M.A et al. Drogas antimicrobianas – Drogas antimicóticas e antivirais. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara. p. 799-807, 1987.
- SANDHU S.S. et al. Pilocarpine content and molecular diversity in jaborandi. **Scientia Agricola**.v.63 n.5, p. 478-82, 2006.
- SANTANA, D.B. **Atividade leishmanicida e antifúngica de extratos de plantas do Cerrado e isolamento do pterocarpano vatacarpina em *Vatairea macrocarpa*.** Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília, p.110, 2013.
- SANTOS, A. P.; MORENO, P. R. H. Alkaloids derived from histidine: imidazole (Pilocarpine, Pilosine). In: **Natural Products**. Springer Berlin Heidelberg, p. 861-882. 2013.

- SANTOS, A. P.; MORENO, P. R. H. *Pilocarpus* spp.: A survey of its chemical constituents and biological activities. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p. 116-137, 2004.
- SANTOS, A.L.S. et al. Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. **FEMS microbiology reviews**, v. 31, n. 5, p. 570-591, 2007.
- SAUER, A. et al. Purulent corneal melting secondary to multidrug-resistant *Fusarium oxysporum* aggravated by topical corticosteroid therapy. **Journal Francais d'ophtalmologie**, v. 31, n. 5, p. 534. e1-5, 2008.
- SHELZ, Z.; MOLNAR, J.; HOHMANN, J.. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. **Fitoterapia**, v. 77, n. 4, p. 279-285, 2006.
- SCHIRALDI, G. et al. Terbinafine versus itraconazole: a long-term, randomized, double-blind, clinical trial in chronic pulmonary aspergillosis. A pilote study. **Journal of Health and Social Sciences** v. 1, n. 1, p. 47-56, 2016.
- SEYEDMOUSAVI, S. et al. Black yeasts and their filamentous relatives: principles of pathogenesis and host defense. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3, p. 527-542, 2014.
- SHARMA, A.; TANIGUCHI, J. Emerging strategies for antimicrobial drug delivery to the ocular surface: Implications for infectious keratitis. **The Ocular Surface**, v. 15, n. 4, p. 670-679, 2017.
- SILVA, J.P.; DE SOUZA, W.; ROZENTAL, S. Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic Region (Brazil). **Mycopathologia**, v. 143, n. 3, p. 171-175, 1998.
- SILVA, V.G. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of epiisopiloturine, an imidazole alkaloid isolated from *Pilocarpus microphyllus*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 6, p. 1071-1077, 2013.
- SILVA-ROCHA, W. P. et al. Clinical improvement of chromoblastomycosis refractory to itraconazole successfully treated with high dose of terbinafine. **The Journal of Dermatology**, v. 40, n. 9, p. 775-776, 2013.
- SKORUPA, L.A. New infraspecific taxa and combinations in *Pilocarpus* Vahl (Rutaceae). **Brazilian Journal of Botany**, v. 26, n. 2, p. 263-270, 2003.
- SLAVIN, M.A.; CHAKRABARTI, A. Opportunistic fungal infections in the Asia-Pacific region. **Medical Mycology**, v. 50, n. 1, p. 18-25, 2012.
- SMITH, S. N. et al. An overview of ecological and habitat aspects in the genus *Fusarium* with special emphasis on the soil-borne pathogenic forms. **Plant Pathol Bull**, v. 16, p. 97-120, 2007.
- SRINIVASAN, M. et al. Epidemiology and aetiological diagnosis of corneal ulceration in Madurai, south India. **British Journal of Ophthalmology**, v. 81, n. 11, p. 965-971, 1997.
- SRINIVASAN, M. Fungal keratitis. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 15, n. 4, p. 321-327, 2004.
- SUN, B; HUANG, W; LIU, M. Evaluation of the combination mode of azoles antifungal inhibitors with CACYP51 and the influence of Site-directed mutation. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 73, p. 157-165, 2017.

SUN, C. Q. et al. Effect of pretreatment with antifungal agents on clinical outcomes in fungal keratitis. **Clinical & Experimental Ophthalmology**, v. 44, n. 9, p. 763-767, 2016.

SUN, C.Q. et al. Association between *in vitro* susceptibility to natamycin and voriconazole and clinical outcomes in fungal keratitis. **Ophthalmology**, v. 121, n. 8, p. 1495-1500. e1, 2014.

SUN, R. L.; JONES, D. B.; WILHELMUS, K. R. Clinical characteristics and outcome of *Candida* keratitis. **American Journal of Ophthalmology**, v. 143, n. 6, p. 1043-1045. e1, 2007.

SVETAZ, L. A. et al. Antifungal drugs combinations: a patent review 2000-2015. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 26, n. 4, p. 439-453, 2016.

TANUMA, H. et al. Case Report. A case of chromoblastomycosis effectively treated with terbinafine. Characteristics of chromoblastomycosis in the Kitasato region, Japan Fallbericht. Ein wirksam mit Terbinafin behandelte Chromoblastomykose-Fall. Charakteristika der Chromoblastomykose in Kitasato, Japan. **Mycoses** -, v. 43, n. 1/2, p. 79-83, 2000.

TANURE, M.A.G. et al. Spectrum of fungal keratitis at Wills eye hospital, Philadelphia, Pennsylvania. **Cornea**, v. 19, n. 3, p. 307-312, 2000.

TATSUMI, Y. et al. Mechanism of action of efinaconazole, a novel triazole antifungal agent. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 2405-2409, 2013.

TAYEL, S. A. et al. Positively charged polymeric nanoparticle reservoirs of terbinafine hydrochloride: preclinical implications for controlled drug delivery in the aqueous humor of rabbits. **Aaps Pharmscitech**, v. 14, n. 2, p. 782-793, 2013.

TAYLOR, S. E.; AL-HASHIMI, I. Pilocarpine, an old drug; a new formulation. **Texas Dental Journal**, v. 113, n. 10, p. 9-13, 1996.

TERRA, F. et al. Novo tipo de dermatite verrucosa mycose por *Acrotheca* com associação de leishmaniosa. **Brazil Med**, v. 36, p. 363-368, 1922.

TEIXEIRA L, COELHO L, TEBALDI ND. Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates and resistance of passion fruit genotypes to fusariosis. *Revista Brasileira de Fruticultura*. V 30, n. 3, 2017.

THOMAS, P. A.; KALIAMURTHY, J. Mycotic keratitis: epidemiology, diagnosis and management. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 3, p. 210-220, 2013.

TSAI, James C. et al. Compliance barriers in glaucoma: a systematic classification. **Journal of Glaucoma**, v. 12, n. 5, p. 393-398, 2003.

TSIFETAKI, N. et al. Oral pilocarpine for the treatment of ocular symptoms in patients with Sjögren's syndrome: a randomised 12 week controlled study. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 62, n. 12, p. 1204-1207, 2003.

TUPAKI-SREEPURNA, A. et al. Multidrug-resistant *Fusarium* in keratitis: a clinico-mycological study of keratitis infections in Chennai, India. **Mycoses**, v. 60, n. 4, p. 230-233, 2017.

UPADHYAY, M. P. et al. The Bhaktapur eye study: ocular trauma and antibiotic prophylaxis for the prevention of corneal ulceration in Nepal. **British Journal of Ophthalmology**, v. 85, n. 4, p. 388-392, 2001.

URTTI, A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 11, p. 1131-1135, 2006.

VALDEZ, I.H. et al. Use of pilocarpine during head and neck radiation therapy to reduce xerostomia and salivary dysfunction. **Cancer**, v. 71, n. 5, p. 1848-1851, 1993.

VAN VUUREN, S.; VILJOEN, A. Plant-based antimicrobial studies—methods and approaches to study the interaction between natural products. **Planta Medica**, v. 77, n. 11, p. 1168-1182, 2011.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A.T. Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. **International Journal of Microbiology**. p.1-26: 2012.

VERAS, L. et al. Activity of epiisopiloturine against *Schistosoma mansoni*. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 13, p. 2051-2058, 2012.

VERAS, L.M.C et al. Industrial scale isolation, structural and spectroscopic characterization of epiisopiloturine from *Pilocarpus microphyllus* Stapf leaves: A promising alkaloid against schistosomiasis. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e66702, 2013.

VICENTE, V. A. et al. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies in Mycology**, v. 61, p. 137-144, 2008.

VICENTE, V. A. et al. Environmental siblings of black agents of human chromoblastomycosis. **Fungal Diversity**, v. 65, n. 1, p. 47-63, 2014.

VOIGTLANDER, H. W.; BALSAM, G.; ENGELHARDT, M. Epiisopiloturin, ein Neues-Alkaloid. *Archiv der Pharmazie*, v. 311, p. 927-935. 1978.

WANG, L. et al. Study of pathogens of fungal keratitis and the sensitivity of pathogenic fungi to therapeutic agents with the disk diffusion method. **Current Eye Research**, v. 40, n. 11, p. 1095-1101, 2015.

WHITCHER, J. P.; SRINIVASAN, M.; UPADHYAY, M. P. Corneal blindness: a global perspective. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 79, p. 214-221, 2001.

WHO. Report of the tenth meeting of the WHO strategic and technical advisory group for neglected tropical diseases. Geneva: WHO, 2017.

WONG, R. L.M. et al. New treatments for bacterial keratitis. **Journal of ophthalmology**, v. 2012.

World Health Organization. Causes of blindness and visual impairment. Available at: <http://www.who.int/blindness/causes/en>. Acessado 24 de Março de 2016.

WORTHINGTON, R.J.; MELANDER, C. Combination approaches to combat multidrug-resistant bacteria. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 177-184, 2013.

WYNN, R. L. Oral pilocarpine (Salagen)-a recently approved salivary stimulant. **General Dentistry**, v. 44, n. 1, p. 26, 29-30, 1996.

XIE, Lixin et al. Spectrum of fungal keratitis in north China. **Ophthalmology**, v. 113, n. 11, p. 1943-1948, 2006.

XIMENES KF, VASCONCELOS KF, MONTE FQ. Epidemiologia de ceratites fúngicas tratadas com ceratoplastia penetrante através de achados histopatológicos. *Brasileira de Oftamologia*. V. 75, n. 3, p. 195-204, 2016.

XUGUANG, S. et al. Ocular fungal isolates and antifungal susceptibility in northern China. **American Journal of Ophthalmology**, v. 143, n. 1, p. 131-133. e1, 2007.

2.8 Objetivos

2.8.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* dos alcaloides isopilocarpina, pilocarpina, epiisopilosina, isopilosina e pilosina, obtidos a partir das folhas do jaborandi, assim como as suas combinações com antifúngicos em isolados de diferentes gêneros.

2.7.2 Objetivos específicos

- Determinar a CIM dos alcaloides do *Pilocarpus microphyllus* contra isolados fúngicos de diferentes gêneros.
- Determinar a CIM do cloridrato de pilocarpina sobre agentes da ceratite fúngica filamentosa.
- Avaliar o perfil de interação *in vitro* do cloridrato de pilocarpina em associação com a terbinafina contra isolados fúngicos de diferentes gêneros, incluindo agentes da ceratite fúngica filamentosa.
- Determinar a CIM da epiisopiloturina sobre agentes da cromblastomicose.
- Determinar o CIM de quatro antifúngicos comercialmente disponíveis (itraconazol, terbinafina, anfotericina B e posaconazol) contra isolados clínicos de agentes da cromblastomicose.
- Avaliar o perfil de interação *in vitro* destes quatro antifúngicos com a epiisopiloturina contra fungos causadores da cromblastomicose.
- Avaliar possíveis alterações morfológicas causadas pela anfotericina B isoladamente ou em combinação da epiisopiloturina em um agente da cromblastomicose.

ITENS SUPRIMIDOS – CAPÍTULOS 2, 3 e 4

5. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE INTERAÇÃO *in vitro* DA EPIISOPILOTURINA COM ANTIFÚNGICOS CONTRA AGENTES DA CROMOBLASTOMICOSE

Resumo

A cromoblastomicose é uma das micoses de implantação mais comuns. Essa doença, predominante de regiões tropicais e subtropicais, apresenta-se como uma infecção crônica da pele e do tecido subcutâneo, acometendo principalmente membros inferiores. Nas formas clínicas mais severas, é sujeita a uma alta taxa de recidiva e baixa taxa de cura, podendo ser refratária à terapia antifúngica atual. Sabendo dessas limitações, faz-se necessária a busca por novas modalidades terapêuticas que visem melhorar a condição dos pacientes afetados. A epiisopiloturina, um alcaloide imidazólico extraído das folhas de *Pilocarpus microphyllus*, apresenta atividade biológica contra *Leishmania amazonensis* e *Schistosoma mansoni*, além de possuir potencial anti-inflamatório e antinociceptivo. Apesar das atividades descritas para esse alcaloide, pouco se sabe sobre sua atividade contra células fúngicas e nenhum trabalho foi realizado para avaliar o seu perfil de interação com fármacos antifúngicos. Esse trabalho objetivou avaliar a atividade antifúngica da epiisopiloturina, assim como o seu potencial de interação com quatro antifúngicos (itraconazol, posaconazol, terbinafina e anfotericina B) contra dezenove isolados fúngicos agentes da cromoblastomicose. O teste de susceptibilidade antifúngica foi conduzido de acordo com o método de microdiluição proposto no protocolo M38-A2 do CLSI. A interação da epiisopiloturina com os fármacos antifúngicos foi realizada utilizando o método tabuleiro de xadrez. Para comparação do efeito das alterações morfológicas da anfotericina B isolada e quando em combinação com a epiisopiloturina, imagens de alta resolução foram obtidas de *Fonsecaea pedrosoi* ATCC 46428 utilizando microscopia de força atômica. A partir dessas imagens foram feitas as análises do perfil e da rugosidade da superfície. A epiisopiloturina, não demonstrou atividade antifúngica nas concentrações testadas (CIM > 256 µg/mL). Curiosamente, este composto mostrou sinergismo para todos os isolados testados quando em associação com os antifúngicos terbinafina e anfotericina B (IFCI = 0,06 – 0,5). Sua interação com o itraconazol e o posaconazol não apresentou um padrão, com resultados sinérgicos e indiferentes. A epiisopiloturina quando em combinação com a terbinafina mostrou ser a interação mais eficiente para todos os isolados testados, com IFCI de até 0,06. Nenhum antagonismo foi visto para as combinações testadas. As imagens microscópicas obtidas revelaram alterações morfológicas em maior proporção quando a epiisopiloturina foi associada à anfotericina B, quando em comparação com quando este antifúngico empregado isoladamente. A partir dos resultados obtidos, com a avaliação da interação e análise das

imagens morfológicas, pode-se constatar que a epiisopiloturina em combinação com antifúngicos pode ser uma terapia promissora no tratamento da cromoblastomicose.

Palavras-chave: anfotericina B, microscopia de força atômica, *Pilocarpus microphyllus*, *Fonsecaea pedrosoi*, Tabuleiro de Xadrez

5.1 Introdução

A cromoblastomicose é uma das infecções de implantação fúngicas causadas por fungos dematiáceos mais prevalentes (QUEIROZ-TELLES et al., 2017). Essa é uma doença polimórfica, que se apresenta como uma infecção crônica, granulomatosa, que afeta os tecidos cutâneos e subcutâneos. Essa micose pode levar a uma infecção secundária, a qual é responsável pela morbidade dessa doença junto com a inabilidade da parte do corpo afetada ou da transformação das células escamosas em carcinoma (DABOIT et al., 2014; PORTO, 2016; QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

As espécies mais frequentemente associadas com a cromoblastomicose pertencem aos gêneros *Fonsecaea* e *Cladophialophora*. Infecções causadas por *Rhinocladiella* spp. são menos frequentes, mas casos de cromoblastomicoses por esse gênero foram reportadas no Brasil recentemente. Alguns casos foram também associados com membros dos gêneros *Phialophora* e *Exophiala*. A prevalência dessa infecção é relatada na América Latina, Caribe, África e Ásia. *Fonsecaea pedrosoi* e *Cladophialophora carrionii* são infecções normalmente observadas em áreas tropicais e subtropicais ao redor do mundo (RIPPON, 1982; ESTERRE, ANDRIANTSHIMAHAVANDY e RAHARISOLO, 1997; QUEIROZ-TELLES et al., 2011; GOMES et al., 2016; SRINIVAS et al., 2016; QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

O tratamento, na maior parte dos casos, é longo e associado com uma baixa taxa de cura e alta taxa de recidiva, especialmente em infecções crônicas e extensas, não sendo possível eleger uma terapia de escolha (DABOIT et al., 2014; QUEIROZ-TELLES et al., 2017). Apesar da variedade da modalidade dos tratamentos, essa doença continua a ser uma das micoses de implantação mais difíceis de erradicar (KRZSCIAK, PINDYCKA-PIASZCZNSKA e PIASZCZYNSKI, 2014). De acordo com alguns ensaios clínicos abertos e não comparativos, o itraconazol é o fármaco com melhores resultados, sendo também o antifúngico mais comumente utilizado. Ainda assim as taxas de cura variam de 15 a 80% (QUEIROZ-TELLES et al., 1992; BONIFAZ, CARRASCO-GERARD e SAUL, 2001; NAJAFZADEH et al., 2010; KRZSCIAK, PINDYCKA-PIASZCZNSKA e PIASZCZYNSKI, 2014; QUEIROZ-TELLES et al., 2017). A terbinafina é o segundo agente antifúngico mais frequentemente utilizado para

o tratamento dessa infecção. Essa alamina tem taxas de cura semelhante as obtidas com itraconazol. Estudos clínicos reportaram melhora da infecção quando a terbinafina é administrada, mas apenas parcial quando esta é administrada isoladamente (ESTERRE et al., 1996; TANUMA et al., 2000; BONIFAZ et al., 2005; QUEDRAOGO et al., 2017; QUEIROZ-TELLES et al., 2017). Dentre os triazólicos de amplo espectro, o posaconazol é a melhor opção para o tratamento de todas as apresentações clínicas da cromoblastomicose, incluindo as formas severas e refratárias. Sua limitação se dá pelo seu alto custo e o fato de não estar disponível na maioria das áreas endêmicas (NEGRONI et al., 2005; CHOWDHARY et al., 2014; KRZSCIĄK, PINDYCKA-PIASZCZNSKA e PIASZCZYNSKI, 2014; QUEIROZ-TELLES et al., 2017). A anfotericina B não é considerada a primeira linha de terapia devido a sua nefrotoxicidade, o que não permite o seu uso a longo prazo. Porém, alguns estudos mostraram a sua atividade sinérgica quando associada com outros fármacos (VITALE et al., 2003; UNGPAKORN; REANGCHAINAM, 2006; DABOIT et al., 2014; QUEIROZ-TELLES, 2015).

Os compostos oriundos de plantas estão sendo alvo de crescentes pesquisas pela ampla gama de estruturas químicas e de atividades biológicas. O *Pilocarpus microphyllus*, uma planta conhecida popularmente como ‘jaborandi’, se destaca como uma das mais importantes da flora brasileira devido aos efeitos terapêuticos do seu princípio ativo pilocarpina. O processo de extração e isolamento da pilocarpina a partir das folhas do jaborandi culmina na geração de uma grande quantidade de biomassa, sendo esta rica em diversas moléculas da classe dos alcaloides imidazólicos. Entre eles, a epiisopiloturina é o alcaloide mais abundante e tem atraído o interesse da comunidade científica (SANTOS e MORENO, 2004; VERAS et al., 2013; MELO et al., 2015; ROY, 2017). As atividades da epiisopiloturina contra *Leishmania amazonensis* e *Schistosoma mansoni* foram relatadas (MIURA, 2009; LEITE et al., 2011; VERAS et al., 2012; VERAS et al., 2013; GUIMARÃES et al., 2015), assim como seu potencial antinociceptivo e anti-inflamatório (SILVA et al., 2013).

Vários azólicos, semelhantes aos encontrados no jaborandi, são antifúngicos clássicos. Sabendo da semelhança estrutural da epiisopiloturina com esses medicamentos, tem-se a possibilidade deste alcaloide apresentar atividade antimicótica. Estudos realizados por nós mostraram que este composto, quando utilizado isoladamente, não apresentou atividade nas concentrações testadas contra os isolados fúngicos avaliados (CARVALHO et al., 2018, no prelo). No entanto, nenhum estudo foi realizado para avaliar a interação deste alcaloide com fármacos antimicóticos.

Assim, esse trabalho teve como objetivo avaliar a atividade da epiisopiloturina em combinação com antifúngicos (itraconazol, posaconazol, terbinafina e anfotericina B) contra agentes da cromoblastomicose, analisando as possíveis alterações morfológicas causadas pela interação entre a anfotericina B e a epiisopiloturina.

5.2 Materiais e métodos

5.2.1 Material vegetal

A planta *Pilocarpus microphyllus*, usada para extração da epiisopiloturina, foi coletada nas regiões costeiras da cidade de Parnaíba (Piauí, Brasil) e foi identificada pela Dr. Ivanilza Moreira de Andrade.

5.2.2 Extração e isolamento da epiisopiloturina

A extração e o isolamento foram feitos de acordo com Veras et al., (2013) e Guimarães et al., (2015). O alcaloide epiisopiloturina foi purificado da biomassa gerada pela produção da pilocarpina realizada por Anidro do Brasil Extrações S.A.

5.2.3 Microrganismos

Dezenove agentes da cromoblastomicose foram utilizados, compreendendo cepas ATCC e isolados clínicos (*Fonsecaea pedrosoi* n = 11; *F. monophora* n = 1; *Cladophialophora carrionii* n = 2; *Phialophora verrucosa* n = 3; *Rhinocladiella aquaspersa* n = 2). *Candida krusei* ATCC 6258 foi usada como controle de qualidade. Todas as amostras usadas pertencem a Grupo de Estudos Avançado em Micologia Médica (GEAMICOL) da Universidade Federal do Piauí, campus Ministro Reis Velloso - Parnaíba, Piauí.

5.2.4 Avaliação da atividade antifúngica *in vitro*

O teste de susceptibilidade antifúngica foi conduzido de acordo com o método de crescimento em microdiluição proposto no documento M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute- CLSI* (CLSI, 2008).

Os fármacos antifúngicos, itraconazol, terbinafina, posaconazol e anfotericina B (Sigma[®], São Paulo, Brasil) foram utilizados. Todos os fármacos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO, Vetec, Brasil). Diluições posteriores foram feitas em meio RPMI 1640 (MP Biomedicals, França) tamponado com ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico (MOPS, Vetec, Brasil), obtendo-se uma concentração final que variou entre 0,03 a 16 µg/mL (CLSI, 2008). A solução estoque de epiisopiloturina foi preparada em DMSO seguida por

diluição em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS. A concentração final de epiisopiloturina variou entre 0,5 - 256 µg/mL.

Os isolados fúngicos foram cultivados em meio ágar batata dextrose e mantidos a 35 °C por um período de 10 dias. A suspensão dos esporos a partir de cada cultura foi preparada em 0,85% de solução salina e ajustada em espectrofotômetro (QUIMIS, São Paulo, Brasil) até atingir uma densidade de 530 nm com transmitância de 68-70%. O inóculo foi diluído a uma proporção de 1:50 em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS. A concentração final do microrganismo atingida foi de $0,4 \times 10^4$ - 5×10^4 UFCs/mL.

O experimento foi realizado usando placas de 96 poços estéreis com fundo em formato 'U'. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada visualmente comparando com o controle de crescimento, após as placas serem mantidas em estufa a 35 °C por um período de 7 dias. O CIM foi definido como a menor concentração da substância que inibe o crescimento do organismo (CLSI, 2008). Todos os testes foram feitos em triplicata.

5.2.5 Avaliação *in vitro* da interação da epiisopiloturina com os antifúngicos

O método tabuleiro de xadrez foi utilizado para avaliar a combinação da epiisopiloturina com os agentes antifúngicos (CUENCA-ESTRELLA, 2004). A suspensão dos esporos foi preparada como descrita anteriormente. O experimento foi realizado em microplacas de 96 poços, em que cada linha e cada coluna continha diluições em séries duplas. A concentração final dos compostos testados variou de 0,03 a 16 µg/mL, para os antifúngicos e entre 0,5 a 256 µg/mL, para a epiisopiloturina. As concentrações dos primeiros poços sem crescimento visível, foram utilizados para calcular o Índice Fracionário de Concentração Inibitória (IFCI). Quando as CIMs foram superiores ou inferiores às concentrações testadas, para fins de cálculo, utilizamos o dobro ou metade da concentração, respectivamente. A interação foi definida como sinérgica quando o valor de IFCI foi $\leq 0,5$, indiferente para $IFCI > 0,5$ e $\leq 4,0$ e antagônica para $IFCI > 4,0$ de acordo com trabalhos recentes (DABOIT et al., 2014).

5.2.6 Análise das alterações morfológicas

Para obtenção das imagens em alta resolução através da Microscopia de Força Atômica (MFA), foi realizado o teste de avaliação de atividade antifúngica da anfotericina B (0,03 - 16 µg/mL) e da epiisopiloturina (0,5 - 256 µg/mL), assim como a interação da combinação de ambos frente a cepa *Fonsecaea pedrosoi* ATCC 46428. Após incubação por 7 dias, 200 µL do meio de cultura contendo os tratamentos (dos poços equivalentes ao subCIM obtidos no ensaio de combinação e do poço em que a no qual a epiisopiloturina estava em sua maior

concentração), bem como 200 μL do meio com as células fúngicas não tratadas (controle de crescimento), foram centrifugadas por 5 minutos a 10.000 $\times g$. Em seguida, as amostras foram lavadas três vezes com tampão PBS ($\text{pH} \approx 7,4$) para remoção do meio de cultura (PETER et al., 2014). Após, 10 μL das amostras centrifugadas foram depositados em uma superfície limpa de vidro, seguida por secagem em estufa a 35 °C por 30 minutos. As amostras foram então gentilmente lavadas com água destilada, para remoção de cristais de sais e outros componentes indesejados do meio de crescimento. Após a lavagem, o material foi seco sob as mesmas condições citadas, antes da análise de MFA. Todas as amostras foram preparadas ao mesmo tempo e expostas às mesmas condições antes de serem examinadas (EATON et al., 2008; de ARAÚJO et al., 2015). O experimento foi conduzido com microscópio TT-AFM (AFM Workshop, EUA), onde as imagens foram realizadas em modo de contato intermitente (*vibration mode*), usando “*cantilevers*” de silício ACT-50 (AppNano, EUA) com frequência de ressonância de aproximadamente 353 kHz. A análise do perfil topográfico e da rugosidade das imagens foram analisadas usando o software Gwyddion versão 2.47. Múltiplas áreas das amostras foram examinadas e imagens representativas foram selecionadas e são mostradas nos resultados.

A análise da rugosidade média de superfície (RS) foi realizada a partir de múltiplas áreas de 1 x 1 μm ($n = 10$) de uma mesma imagem. As análises foram feitas para a cepa sem tratamento, assim como para as células fúngicas tratadas com anfotericina B e epiisopiloturina, isoladamente. Diferenças entre a RS foram analisadas por meio do teste estatístico ANOVA com pós-teste de Dunnett, usando o programa GraphPad Prism® 6.0. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5.3 Resultados

5.3.1 Avaliação da atividade antifúngica *in vitro*

Todos os isolados testados foram sensíveis para itraconazol (CIM = 0,25 – 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (tabela 5.1), posaconazol (CIM = 0,25 – 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (tabela 5.2) e terbinafina (CIM = 0,06 – 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (tabela 5.3). A anfotericina B mostrou CIMs de 4 a 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (tabela 4). Nenhum dos isolados testados tiveram seu crescimento inibido pela epiisopiloturina nas concentrações testadas (CIM > 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Tabela 5.1).

5.3.2 Avaliação *in vitro* da interação da epiisopiloturina com os antifúngicos

De acordo com a interpretação dos valores da IFCI, quando a combinação epiisopiloturina/itraconazol foi testada obteve-se interação sinérgica (IFCI = 0,48 – 0,5) para

sete isolados e interação indiferente (IFCI = 0,53 - 1) para dez isolados (Tabela 5.1). O posaconazol quando em associação com o alcaloide mostrou sinergismo para sete isolados fúngicos (IFCI = 0,24 - 0,5) e indiferente para sete (IFCI = 0,53 - 1,25) (Tabela 2). A epiisopiloturina combinada com terbinafina mostrou interação sinérgica (IFCI 0,06 - 0,5) para todos os isolados testados (Tabela 5.3). Para a combinação de anfotericina B/epiisopiloturina todos os isolados avaliados mostraram sinergismo, com o mesmo valor de IFCI (0,5) (Tabela 5.4). O melhor efeito sinérgico para essa combinação foi visto em *Fonsecaea monophora* 69704 e *F. pedrosoi* ATCC 46422 (IFCI = 0,06) a partir da interação epiisopiloturina/terbinafina. Nenhum antagonismo foi encontrado nenhuma dessas combinações.

5.3.2 Análise das alterações morfológicas

O efeito das alterações morfológicas da epiisopiloturina e da anfotericina B, isoladamente, assim como o efeito da combinação de ambas nas células de *F. pedrosoi* ATCC 46428 são mostradas na Figura 5.1. A combinação da epiisopiloturina/anfotericina B apresentou alteração na hifa (Figura 5.1 - B), em comparação com o controle (Figura 5.1 - A), com destruição total e possível extravasamento do material citoplasmático.

Na análise de perfil topográfico, os tratamentos avaliados na mesma concentração dos subCIM obtidos na combinação apresentaram volume igual (1,8 μm) (Figura 5.2 - B) ou similar (1,6 μm) (Figura 5.2 - C) ao controle (1,8 μm) (Figura 5.2 - A). No entanto, a epiisopiloturina quando testada na maior concentração (256 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 5.2 - D), levou a um aumento de volume da hifa (2,64 μm) quando comparado ao controle (1,8 μm). No que se refere aos valores da análise de rugosidade da superfície, o controle (fungo sem tratamento) apresentou o menor valor médio de rugosidade ($112,38 \pm 15,45$ nm) e a cepa tratada com anfotericina B isolada com o maior valor, $251,71 \pm 43,29$ nm (Tabela 5.5, Figura 5.3), $p < 0.001$.

5.4 Discussão

A cromoblastomicose é uma micose de difícil tratamento e que muitas vezes não responde a várias modalidades de terapia, não possuindo um procedimento ou fármaco de escolha (TORRES-GUERRERO et al., 2012; DABOIT et al., 2014). Devido ao aumento da taxa de resistência fúngica e ao incipiente desenvolvimento de novos agentes antimicóticos, a terapia de combinação entre fármacos vem surgindo como uma abordagem para melhorar a eficácia dos mesmos (SVETAZ et al., 2016; CAMPITELLI et al., 2017).

Tabela 5.1. Atividade *in vitro* da combinação antifúngica da episopiloturina (EPII) com itraconazol (ITRA) contra agentes da cromoblastomicose.

Isolados fúngicos	Valores de CIM ^a dos compostos (µg/mL)				IFCI ^b	Interpretação
	Isolado		Em combinação			
	EPII	ITRA	EPII	ITRA		
<i>Fonsecaea</i> spp.						
<i>F. pedrosoi</i> 1	>256	0,5	0,5	0,25	0,50	Sinérgica
<i>F. pedrosoi</i> ATCC 46422	>256	0,25	32	0,12	0,54	Indiferente
<i>F. pedrosoi</i> 1420	>256	0,25	0,5	0,25	1,00	Indiferente
<i>F. pedrosoi</i> ATCC 46428	>256	0,25	0,5	0,12	0,50	Sinérgica
<i>F. pedrosoi</i> 43456	>256	0,50	0,5	0,25	0,50	Sinérgica
<i>F. pedrosoi</i> 25	>256	0,25	0,5	0,25	1,00	Indiferente
<i>F. pedrosoi</i> 38869	>256	0,25	0,5	0,12	0,50	Sinérgica
<i>F. pedrosoi</i> 458 MT	>256	0,25	16	0,12	0,53	Indiferente
<i>F. pedrosoi</i> 42	>256	0,25	0,5	0,25	1,00	Indiferente
<i>F. pedrosoi</i> 1256 MT	>256	0,25	0,5	0,25	1,00	Indiferente
<i>F. pedrosoi</i> AR4	>256	0,25	0,5	0,25	1,00	Indiferente
<i>F. monophora</i> 69704	>256	0,25	1	0,12	0,48	Sinérgica
<i>Cladophialophora</i> spp.						
<i>C. carrionii</i> 768	>256	0,25	0,5	0,25	1,00	Indiferente
<i>Phialophora</i> spp.						
<i>P. verrucosa</i> ICB	>256	0,25	64	0,12	0,60	Indiferente
<i>P. verrucosa</i> UFSM	>256	0,25	0,5	0,25	1,00	Indiferente
<i>P. verrucosa</i> 1	>256	0,25	0,5	0,12	0,50	Sinérgica
<i>Rhinocladiella</i> spp.						
<i>R. aquaspera</i> 691	>256	0,25	0,5	0,12	0,50	Sinérgica

^aCIM, concentração inibitória mínima, ^bIFCI, índice fracionário da concentração inibitória.

Tabela 5.2. Atividade da combinação antifúngica da epiisopiloturina (EPII) com posaconazol (POSA) contra agentes da cromoblastomicose.

Isolados fúngicos	Valores de CIM ^a dos compostos (µg/mL)				IFCI ^b	Interpretação
	Isolado		Em combinação			
	EPII	POSA	EPII	POSA		
<i>Fonsecaea</i> spp.						
<i>F. pedrosoi</i> 1	>256	0,25	1,0	0,25	1,00	Indiferente
<i>F. pedrosoi</i> ATCC 46422	>256	0,25	16	0,12	0,53	Indiferente
<i>F. pedrosoi</i> ATCC 46428	>256	0,5	0,5	0,12	0,24	Sinérgica
<i>F. pedrosoi</i> 43456	>256	0,5	0,5	0,25	0,50	Sinérgica
<i>F. pedrosoi</i> 25	>256	0,5	128	0,50	1,25	Indiferente
<i>F. pedrosoi</i> 38869	>256	0,25	0,5	0,12	0,50	Sinérgica
<i>F. pedrosoi</i> 458MT	>256	0,5	8	0,12	0,25	Sinérgica
<i>F. pedrosoi</i> 42	>256	1	128	0,50	0,75	Indiferente
<i>F. pedrosoi</i> AR4	>256	0,12	2	0,12	1,00	Indiferente
<i>F. monophora</i> 69704	>256	0,25	0,5	0,12	0,50	Sinérgica
<i>Phialophora</i> spp.						
<i>P. verrucosa</i> UFSM	>256	0,50	0,5	0,50	1,00	Indiferente
<i>P. verrucosa</i> 1	>256	0,25	0,5	0,12	0,50	Sinérgica
<i>Rhinocladiella</i> spp.						
<i>R. aquaspera</i> 691	>256	0,25	0,5	0,12	0,50	Sinérgica
<i>R. aquaspera</i> 1370	>256	0,12	8	0,12	1,00	Indiferente

^aCIM, concentração inibitória mínima, ^bIFCI, índice fracionário da concentração inibitória.

Tabela 5.3. Atividade da combinação antifúngica da epiisopiloturina (EPII) com terbinafina (TERB) contra agentes da cromoblastomicose.

Isolados fúngicos	Valores de CIM ^a dos compostos (µg/mL)				IFCI ^b	Interpretação
	Isolado		Em combinação			
	EPII	TERB	EPII	TERB		
<i>Fonsecaea</i> spp.						
<i>F. pedrosoi</i> 1	>256	0,25	128	0,03	0,37	Sinérgica
<i>F. pedrosoi</i> ATCC 46422	>256	0,25	<0,05	<0,03	0,06	Sinérgica
<i>F. pedrosoi</i> 1420	>256	0,06	<0,05	<0,03	0,25	Sinérgica
<i>F. pedrosoi</i> ATCC 46428	>256	0,12	0,5	0,06	0,50	Sinérgica
<i>F. pedrosoi</i> 25	>256	0,06	2	0,03	0,50	Sinérgica
<i>F. pedrosoi</i> 38869	>256	0,12	0,5	0,06	0,50	Sinérgica
<i>F. pedrosoi</i> 458MT	>256	0,12	16	0,03	0,28	Sinérgica
<i>F. pedrosoi</i> 42	>256	0,25	128	0,03	0,50	Sinérgica
<i>F. monophora</i> 69704	>256	0,25	<0,5	<0,03	0,06	Sinérgica
<i>Cladophialophora</i> spp.						
<i>C. carrionii</i> 768	>256	0,25	1	0,06	0,24	Sinérgica
<i>C. carrionii</i> 68	>256	0,25	128	0,06	0,50	Sinérgica
<i>Phialophora</i> spp.						
<i>P. verrucosa</i> ICB	>256	0,25	32	0,06	0,30	Sinérgica
<i>P. verrucosa</i> UFSM	>256	0,06	<0,5	<0,03	0,25	Sinérgica
<i>Rhinocladiella</i> spp.						
<i>R. aquaspera</i> 691	>256	0,06	<0,5	<0,03	0,25	Sinérgica

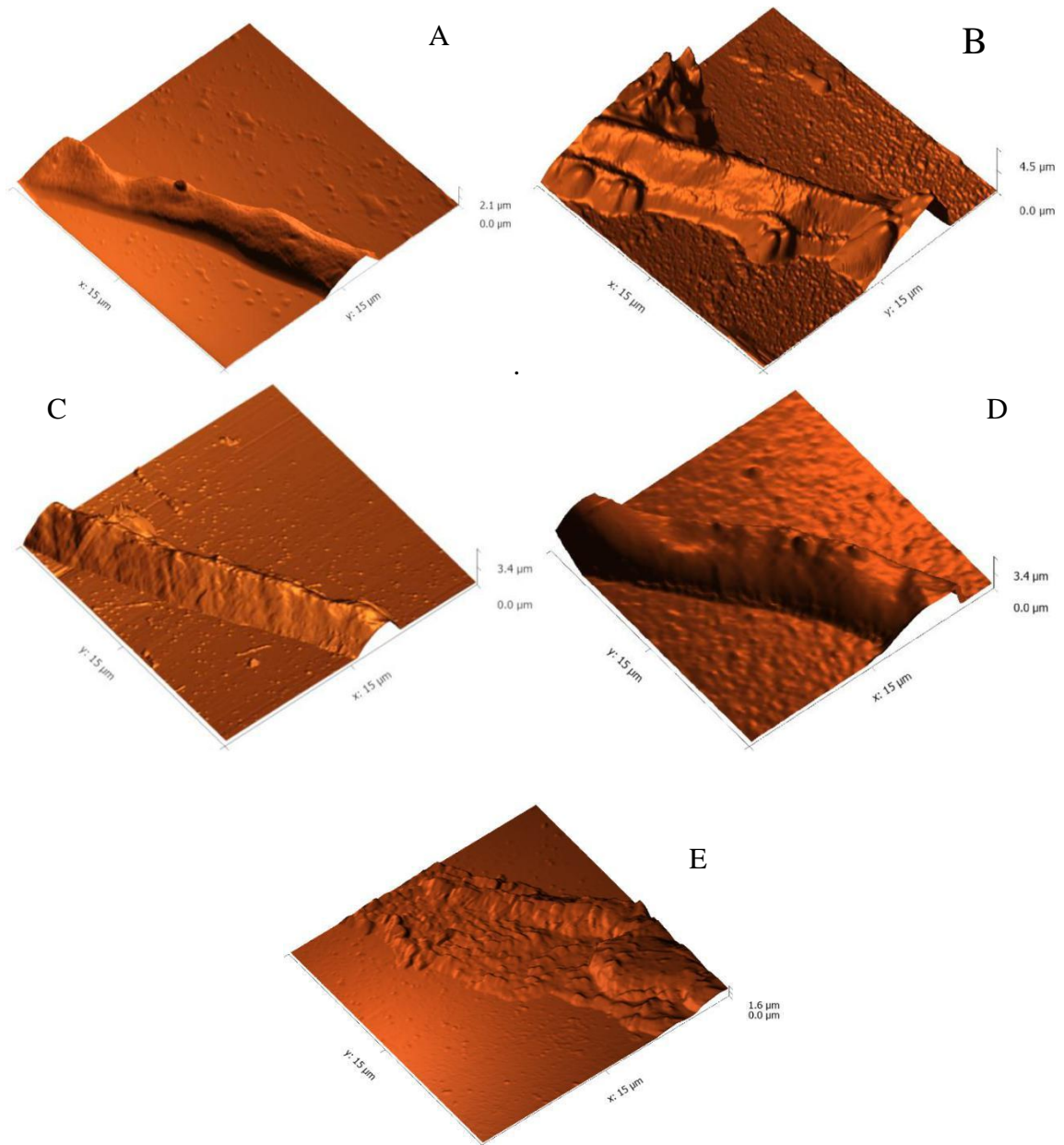
^aCIM, concentração inibitória mínima, ^bIFCI, índice fracionário da concentração inibitória.

Tabela 5.4. Atividade da combinação antifúngica da epiisopiloturina (EPII) com anfotericina B (AmB) contra agentes da cromoblastomicose.

Isolados Fúngicos	Valores do CIM ^a dos compostos (µg/mL)				IFCI ^b	Interpretação
	Isolado		Em combinação			
	EPII	AmB	EPII	AmB		
<i>Fonsecaea</i> spp.						
<i>F. pedrosoi</i> 1	>256	8	0,5	4	0,50	Sinérgica
<i>F. pedrosoi</i> ATCC 46422	>256	8	0,5	4	0,50	Sinérgica
<i>F. pedrosoi</i> 1420	>256	8	0,5	4	0,50	Sinérgica
<i>F. pedrosoi</i> ATCC 46428	>256	8	0,5	4	0,50	Sinérgica
<i>F. pedrosoi</i> 43456	>256	8	0,5	4	0,50	Sinérgica
<i>F. pedrosoi</i> 38869	>256	8	0,5	4	0,50	Sinérgica
<i>F. monophora</i> 69704	>256	4	0,5	2	0,50	Sinérgica
<i>Cladophialophora</i> spp.						
<i>C. carrionii</i> 768	>256	4	0,5	2	0,50	Sinérgica
<i>C. carrionii</i> 68	>256	8	0,5	4	0,50	Sinérgica
<i>Phialophora</i> spp.						
<i>P. verrucosa</i> ICB	>256	8	0,5	4	0,50	Sinérgica
<i>Rhinocladiella</i> spp.						
<i>R. aquaspera</i> 691	>256	8	0,5	4	0,50	Sinérgica
<i>R. aquaspera</i> 1360	>256	4	0,5	2	0,50	Sinérgica

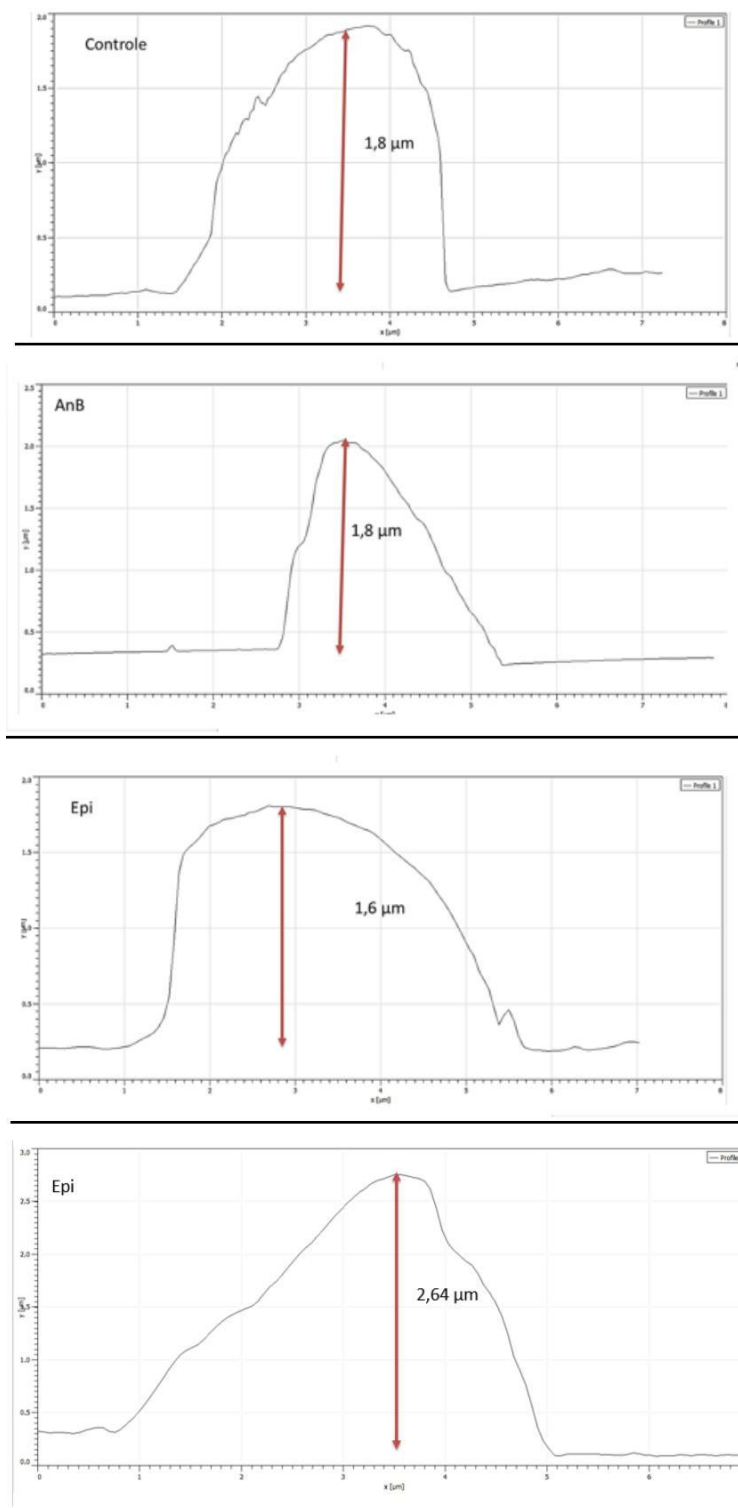
^aCIM, concentração inibitória mínima, ^bIFCI, índice fracionário da concentração inibitória.

Figura 5.1. Imagens de microscopia de força atômica de *Fonsecaea pedrosoi* ATCC 46428 tratado com a episopiloturina e a anfotericina B isoladas e em combinação.



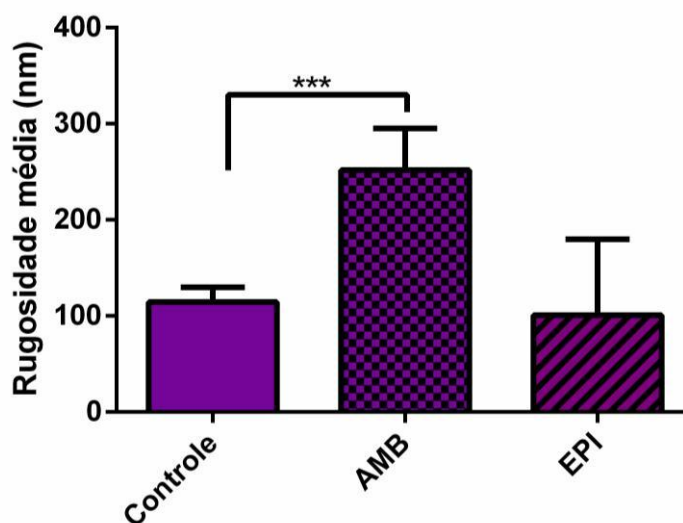
Legenda: A) Fungo sem tratamento (controle). B) Fungo tratado com episopiloturina na concentração máxima testada (256 $\mu\text{g/mL}$). C) Fungo tratado com anfotericina isoladamente (2 $\mu\text{g/mL}$). D) Fungo tratado com episopiloturina isoladamente (16 $\mu\text{g/mL}$). E) Fungo tratado na concentração do sub-CIM da combinação episopiloturina (16 $\mu\text{g/mL}$) com anfotericina B (2 $\mu\text{g/mL}$).

Figura 5.2. Perfil topográfico correspondente das células de *Fonsecaea pedrosoi* ATCC 46428 a partir da microscopia de força atômica.



Legenda: A) Fungo sem tratamento (controle); B) Fungo tratado com anfotericina B (2 µg/mL); C) Fungo tratado com epiisopiloturina (16 µg/mL); D) Fungo tratado com epiisopiloturina (256 µg/mL).

Figura 5.3. Valores da rugosidade média das células de *Fonsecaea pedrosoi* ATCC 46428 quando tratadas com epiisopiloturina (EPII) e com anfotericina B (AMB).



Legenda: AmB – 2 µg/mL e EPII – 16 µg/mL

*** Significância estatística com $p < 0,001$

Tabela 5.5 Estatística descritiva dos valores de rugosidade.

Amostra	N	Rugosidade (nm)			
		Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
Controle	10	88,50	132,20	112,38	15,45
AmB (2 µg/mL)	10	176,00	303,40	251,71	43,29
EPII (256 µg/mL)	10	138,50	323,00	219,28	57,48
EPII (16 µg/mL)	10	27,57	237,4	100,98	78,89

AmB = anfotericina B; EPII = epiisopiloturina

Os valores da CIM obtidos para todos os isolados estão de acordo com valores vistos na literatura (NAJAFZADEH et al., 2010; DABOIT et al., 2014; LIN, WAN e LIN, 2014). No tratamento de infecções causadas por fungos filamentosos negros, CIM ≤ 1 µg/mL são geralmente usados como indicador do potencial de susceptibilidade de muitos fármacos (MINOTO et al., 2001; REVANKAR e SUTTON, 2010; DABOIT et al., 2014). Em vista disso, a anfotericina B apresentou sensibilidade reduzida para os agentes testados, podendo esse fato estar associado à própria constituição da membrana desses fungos, que sofrem variações quanto ao seu nível de esteróis. Assim, um baixo nível de ergosterol, alvo principal da anfotericina B,

acarretaria em uma CIM mais alta para esse fármaco (GOMES e RESENDE, 1991; GHANNOUM e RICE, 1999). A epiisopiloturina não mostrou atividade nas concentrações utilizadas contra os isolados testados. Esse resultado vai de acordo com um estudo desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, em que um ensaio de prospecção da atividade antifúngica com a epiisopiloturina não apresentou atividade contra fungos leveduriformes e filamentosos. Esse resultado foi associado à possível incapacidade desse alcalóide de se ligar à lanosterol 14 α -demetilase (CARVALHO et al., 2018, no prelo), um dos principais alvos dos antifúngicos clássicos. Apesar disso, este não é o único mecanismo de ação dos antifúngicos utilizados na terapia atual. Estes, podem agir diretamente nos esteróis da membrana, agir em outras enzimas da via de síntese do ergosterol, inibir a síntese de parede das células fúngicas ou até mesmo atuar na inibição macromolecular (EL-GARHY, 2015). Além disso, esse estudo foi composto por um número amostral reduzido.

Curiosamente, apesar da epiisopiloturina não apresentar atividade antifúngica, quando esta foi testada isoladamente, esse composto mostrou atividade sinérgica quando combinado com agentes antifúngicos. Os fármacos triazólicos, como o itraconazol e o posaconazol, tem seus mecanismos de ação baseados na inibição da lanosterol 14 α -demetilase, que é necessária para a conversão do lanosterol em ergosterol, o qual é importante para a estabilidade da membrana fúngica. Outros alvos secundários ao longo da via de biossíntese desse esterol são também afetados por esses fármacos, gerando acúmulo de esteróis tóxicos, que danificam a célula, levando à morte (GHANMOUND e RICE, 1999; DON SHEPPARD e HARRY, 2004; GUBBINS e ANAISSIE, 2006; EL-GARHY, 2015). O fato desses triazólicos serem agentes fungistáticos, poderia explicar o efeito obtido na associação com a epiisopiloturina, na qual, a interação aparenta não seguir um padrão (IFCI = 0,48 – 1,25), resultado esse visto em outros estudos (VITALE et al., 2003; LI, WAN e LI, 2014). Essa atividade fungistática, promoveria uma inibição apenas parcial da síntese do ergosterol, com um acúmulo de esteróis tóxicos variando de acordo com as cepas, o que resultaria na variação da permeabilidade da membrana entre os isolados. Essa variação, seria a responsável por diferentes quantidades de epiisopiloturina absorvida, o que afetaria o seu perfil de interação com o fármaco. Apesar do efeito da interação da epiisopiloturina com os triazólicos testados não ter sido sinérgico para todos os isolados avaliados, esta foi sinérgica para sete isolados em cada combinação e nenhum antagonismo foi observado.

A anfotericina B em combinação com a epiisopiloturina mostrou atividade sinérgica para todos os isolados testados. Este, é um agente fungicida, o que pode levar a uma destruição maior na célula fúngica. Além disso, tem o seu mecanismo de ação pela interação com o

ergosterol da membrana, o que resulta em poros aquosos que alteram a permeabilidade, levando a extravasamento celular. Estudos mostraram sua atividade sinérgica com a 5-fluorocitosina a qual inibe a síntese macromolecular, em associação com a anfotericina B. Esse resultado foi explicado pelo melhoramento na absorção desse composto, causado por essa capacidade da anfotericina B de formar de poros na membrana. A anfotericina B é nefrotóxica, não sendo considerada uma terapia de primeira linha. Sabendo que este fármaco pode ser usado em pacientes instáveis, com graves infecções, diminuir a quantidade desse polieno é primordial para redução da toxicidade (MEDOFF, COMFORT e KOBAYASHI, 1971; GHANNOUM e RICE, 1999; DABOIT et al., 2014).

Segundo Daboit et al. (2013, 2014), a terbinafina apresenta efeito sinérgico quando em combinação em agentes da cromoblastomicose. Esse antifúngico, é também um agente fungicida. Apesar da morte fúngica causada por esse fármaco se dar primeiramente devido ao acúmulo de esqualeno, ao invés da deficiência de ergosterol, os altos níveis do esqualeno levam ao aumento da permeabilidade da membrana, o que poderia aumentar a entrada da epiisopiloturina, permitindo-a atuar sinergicamente sobre os agentes da cromoblastomicose. Esse foi o fármaco que apresentou maior atividade sinérgica em combinação com a epiisopiloturina, com valores de IFCI chegando a até 0.06. Além disso, a terbinafina também tem vantagens sobre o itraconazol. A mesma apresenta menos interações medicamentosas e apresenta uma ação antifibrótica, o que poderia ajudar nas lesões dessa doença da cromoblastomicose (RYDER e FAVRE, 1997; GHANNOUM e RICE, 1999; RYDER e LEITNER, 2001; HOWDEN et al., 2003; ESTERRE e QUEIROZ-TELLES, 2006; SILVA-ROCHA et al., 2013; DABOIT et al., 2014; KRZYŚCIAK, PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA; PIASZCZYŃSKI, 2014; QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

Apesar de todas as atividades descritas para epiisopiloturina, o seu mecanismo de ação ainda é desconhecido. Tendo em vista os resultados obtidos neste e em trabalhos anteriores, sugerimos um mecanismo pelo qual esse alcaloide poderia agir sinergicamente com antimicóticos convencionais em agentes da cromoblastomicose. Como a epiisopiloturina não apresentou atividade antifúngica quando usada isoladamente e apresentou atividade sinérgica quando associada a antifúngicos (terbinafina e anfotericina B), é possível que esse composto tenha um alvo no interior da célula fúngica. A maioria dos agentes antifúngicos usados na clínica tem sua atividade pela inibição da síntese ou pela direta interação com o ergosterol. Esse esterol funciona como um regulador para a fluidez e assimetria, consequentemente influenciando no transporte de materiais através das membranas (NOZAWA e MORITA, 1986; PARKS e CASEY, 1996; GHANNOUM e RICE, 1999).

Com base nos resultados nossa hipótese é de que, após a ruptura causada na membrana pelos antifúngicos, a epiisopiloturina passaria a ter acesso ao espaço intracelular e assim poderia atingir o seu alvo. Isso explicaria a atividade sinérgica obtida quando este alcaloide foi associado com os fármacos. Levando em consideração o mecanismo de ação da anfotericina B, e levantando a hipótese de que epiisopiloturina tenha um alvo intracelular, era esperado que esta combinação apresentasse o maior potencial sinérgico, dado que a formação de poros levaria a uma maior entrada da epiisopiloturina no citoplasma das células fúngicas. Mas, apesar da atividade sinérgica apresentada, a interação do alcaloide com a terbinafina mostrou-se com valores de IFCI melhores, quando em comparação com a interação com a anfotericina B. Quanto menor o valor do IFCI, melhor a ação sinérgica, uma vez que quantidades reduzidas de dois compostos são necessárias para a morte das células fúngicas. A entrada da epiisopiloturina nas células fúngicas, poderia levar, além da atuação dessa molécula em um alvo intracelular, a uma maior entrada de terbinafina, potencializando seus efeitos. Observação semelhante foi vista em um estudo anterior, onde, apesar de não apresentar atividade isoladamente para *Aspergillus* spp., o fluconazol aumentou a atividade da terbinafina. Tal sinergismo foi creditado ao fato de que pequenas concentrações de fluconazol permitiram que terbinafina adentrasse em maiores quantidades, através de transportadores de multi-fármacos.

Os alvos intracelulares para a ação da epiisopiloturina que sugerimos seriam as topoisomerases. Estas, são enzimas nucleares altamente especializadas que removem a tensão super-helicoidal dos cromossomos e permitem a replicação e transcrição do DNA. São identificadas como importantes alvos terapêuticos, uma vez que sua inibição causaria danos significativos no DNA (PAL e KATIYAR, 2017). Em princípio, qualquer célula que tiver altos níveis de topoisomerases é um alvo vulnerável para este tipo de inibidor. Apesar de não se ter pesquisas relatando a quantificação de topoisomerases em agentes da cromoblastomicose, esta enzima foi reportada em outros fungos, tais como: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus niger*, dermatófitos e *Sporothrix* spp. (SHEN et al., 1992; DEL POETA et al., 1999; KAMIYA et al., 2004; KABEN et al., 2005; HARISH E KATIYAR, 2017).

Wen e colaboradores (2016) analisaram o efeito de derivados imidazólicos da berberina em bactérias e fungos. Eles reportaram que a adição do grupamento imidazólico levou a uma maior eficácia quando em comparação com o antifúngico testado. E, através de docagem molecular, relataram que o derivado imidazólico poderia formar pontes de hidrogênio com um aminoácido da topoisomerase IB, através do átomo de nitrogênio do grupamento imidazólico, o que indicaria a necessidade de tal grupamento para aumento da bioatividade. A

epiisopiloturina, poderia, então, estar agindo como esse derivado, apresentando uma afinidade de ligação com as topoisomerasas, devido à presença do anel imidazólico em sua estrutura.

Uma outra evidência de que epiisopiloturina pode ter este alvo é vista quando analisamos o estudo realizado por Nakajima et al. (1995). Nesse trabalho eles reportaram a interação da DU-6859a, uma fluoroquinolona (inibidora de topoisomerasas II) com antifúngicos. Foi observado, que essa fluoroquinolona aumentou a atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* da anfotericina B e do fluconazol contra espécies de *Candida*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*, apesar de não apresentar atividade antifúngica quando testada isoladamente. A melhor interação foi vista quando essa quinolona foi associada com a anfotericina B, possivelmente pelo seu perfil de ação ser fungicida, o que levaria a uma maior destruição da membrana e à uma maior entrada de quinolona para o espaço intracelular (NAKAJIMA et al., 1995). Estes resultados são similares aos encontrados em nosso estudo, onde a epiisopiloturina não possui atividade antifúngica quando isolada, mas aumentou a atividade dos antifúngicos quando associada.

Um outro estudo também avaliou o potencial sinérgico das quinolonas em associação com anfotericina B ou itraconazol contra *Exophiala spinifera*, um fungo dematiáceo que apesar de ser mais associado com a feohifomicose, também é um agente causador da cromoblastomicose (VITALLE et al., 2003). Relatos de outras fluoroquinolonas potencializando a atividade de agentes antifúngicos são encontrados em outros estudos (WALSH et al., 1983; VANGDAL e BERGAN, 1984; PETROU e ROGERS, 1988). A similaridade dos nossos resultados com outros encontrados na literatura com os inibidores de topoisomerasas reforçam nossa hipótese da ação da epiisopiloturina. Porém, não podemos limitar a ação deste alcaloide a estas enzimas e tampouco excluir a possibilidade da epiisopiloturina agir em outro alvo intracelular.

No entanto, a possível ação da epiisopiloturina nas topoisomerasas, também explicaria a atividade que este alcaloide obteve contra a *Leishmania amazonensis*. Miura (2009), em um estudo *in vitro* demonstrou que a epiisopiloturina apresenta atividade contra a forma amastigota, porém não demonstrou mortalidade detectável na forma promastigota nas concentrações avaliadas. A forma amastigota possui o glicocálice de menor espessura quando comparado com a forma promastigota (PEDER 2006; KAYE e SCOTT 2011; AQUINO, 2014). Essa variação na membrana plasmática poderia aumentar a absorção de epiisopiloturina intracelularmente, permitindo-a alcançar o seu alvo. Além disso, as topoisomerasas são consideradas como um alvo terapêutico para esquistossomose (RANA e MISRA-BHATTACHAYA, 2013).

Diante da possibilidade da epiisopiloturina atuar em um alvo intracelular, analisamos as imagens de MFA (Figura 5.1) desse alcaloide e da anfotericina B isoladamente e em combinação, para verificamos as alterações fúngicas externas. Apesar da combinação epiisopiloturina/anfotericina B não ter apresentado o menor valor de IFCI, acreditamos que este fármaco nos daria uma melhor representação da entrada da epiisopiloturina para o meio intracelular, devido ao mecanismo de ação desse antifúngico, que age diretamente no ergosterol presente na membrana fúngica, formando poros e afetando a permeabilidade (GHANNOUM e RICE, 1999). Esses poros, permitiriam a internalização da epiisopiloturina, o que, possivelmente, possibilitaria o efeito inibitório desse alcaloide, juntamente com a anfotericina B.

As hifas do fungo não tratado, mostram-se com parede intacta sem nenhuma modificação na sua estrutura. Em contraste, com a concentração sub-CIM para a combinação epiisopiloturina/anfotericina B, onde é visto a destruição total da célula fúngica, com perda da integridade celular, e possível extravasamento dos conteúdos citoplasmáticos em uma concentração de 2 µg/mL de anfotericina B e 16 µg/mL para epiisopiloturina. A mesma concentração desse antifúngico e da epiisopiloturina, quando usados isoladamente, não causaram alterações morfológicas visíveis. A epiisopiloturina na concentração mais alta (256 µg/mL) também não causou nenhuma alteração visível, uma vez que o valor de Z não representa apenas a hifa e sim a imagem como um todo.

Para análise de um possível aumento do volume das hifas, foi realizada a análise do perfil topográfico das imagens obtidas (Figura 5.2). O que se observa é que tanto o controle quando as células tratadas com os compostos isoladamente (na mesma concentração do subCIM da combinação), apresentaram um volume similar, não possuindo assim, alterações no volume. A epiisopiloturina na concentração de 256 µg/mL, no entanto, causou um aumento no volume quando em comparação ao controle. Esse aumento pode ser devido ao fato, desse alcaloide em concentrações mais elevadas conseguir adentrar na célula fúngica, o que poderia causar uma perturbação no equilíbrio osmótico, explicando assim o aumento do volume da hifa.

No que se refere à análise da rugosidade de superfície, a epiisopiloturina quando testada isoladamente, apresenta danos na membrana da hifa (média RS = 219,28), porém a concentração testada foi de 256 µg/mL, uma concentração 16x maior do que a que apresentou sinergismo (16 µg/mL). Essa alteração, mesmo assim, foi inferior à encontrada para a anfotericina B (RS = 251,71). Dessa forma, é possível que essa alteração da superfície da membrana, quando a anfotericina B é testada a uma concentração de 16 µg/mL, possivelmente

permitiu a entrada da epiisopiloturina, que após agir sobre os alvos intracelulares, causou uma destruição severa na célula fúngica. A epiisopiloturina na concentração de 16 µg/mL, não apresentou significância estatística quanto à análise de rugosidade. O fato da epiisopiloturina ter apresentado alteração na rugosidade na concentração de 256 µg/mL, reforça a hipótese levantada com a análise do perfil topográfico, no qual este alcaloide, em concentrações mais altas, poderia conseguir ter acesso ao espaço intracelular, ou ainda agir em algum alvo da membrana ou parede fúngica.

5.5 Conclusão

Com os resultados obtidos, verificamos a ação sinérgica exercida pela epiisopiloturina com os agentes antifúngicos. Esse efeito sinérgico se mostra promissor contra agentes da cromoblastomicose. Além do efeito sinérgico, sua combinação com a terbinafina, juntamente com a atividade anti-inflamatória exercida pela epiisopiloturina, ajudaria nas lesões granulomatosas; em associação com a anfotericina B, reduziria sua toxicidade pela utilização de menores doses. Sabendo do potencial de algumas quinolonas em aumentar a atividade antifúngica em conjunto com antimicóticos e os efeitos das interações obtidos, sugerimos que esse alcaloide poderia ter como alvo as topoisomerasas, o que não exclui a possibilidade deste agir em outros alvos. Mais estudos precisam ser realizados para elucidar o mecanismo de ação da epiisopiloturina. Este poderia ajudar no entendimento de algumas das atividades biológicas que a epiisopiloturina possui.

5.6 Referências

AQUINO, D. S. de. Avaliação do efeito microbicida da filosseptina-1 nas formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* *in vitro*. 2014.

BONIFAZ, A. et al. Treatment of chromoblastomycosis with terbinafine: experience with four cases. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 16, n. 1, p. 47-51, 2005.

BONIFAZ, A.; CARRASCO-GERARD, E.; SAUL, A. Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. **Mycoses**, v. 44, n. 1-2, p. 1-7, 2001.

CAMPITELLI, M. et al. Combination Antifungal Therapy: A Review of Current Data. **Journal of Clinical Medicine Research**, v. 9, n. 6, p. 451, 2017.

CARVALHO, A.M.A. et al. Epiisopiloturine, an imidazole alkaloid: *in vitro* antifungal activity and molecular Docking. 2018. **No prelo**.

CHOWDHARY, A. et al. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of systemic phaeohyphomycosis: diseases caused by black fungi. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, p. 47-75, 2014.

CLSI. Reference Method for broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi Approved Standard – Second Edition. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

CUENCA-ESTRELLA, M. Combinations of antifungal agents in therapy–what value are they?. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 5, p. 854-869, 2004.

DABOIT, T.C. et al. A case of relapsed chromoblastomycosis due to *Fonsecaea monophora*: antifungal susceptibility and phylogenetic analysis. **Mycopathologia** v. 176, p. 139-144, 2013.

DABOIT, T.C. et al. *In vitro* susceptibility of chromoblastomycosis agents to five antifungal drugs and to the combination of terbinafine and amphotericin B. **Mycoses**, v. 57, n. 2, p. 116-120, 2014.

DE ARAUJO, A. R. et al. Antibacterial, antibiofilm and cytotoxic activities of *Terminalia fagifolia* Mart. extract and fractions. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 14, n. 1, p. 25, 2015.

DEL POETA, M. et al. Topoisomerase I is essential in *Cryptococcus neoformans*: role in pathobiology and as an antifungal target. **Genetics** 152.1 167-178, 1999.

DON SHEPPARD M.D, HARRY W.L. **Antifungal agents**, in “**Basic and Clinical Pharmacology**”, 9th Katzung, Eds, Norwalk, Connecticut: Appleton and Lange; 2004.

EATON, P. et al. Anti-leishmanial activity of the antimicrobial peptide DRS 01 observed in *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 10, n. 2, p. 483-490, 2014.

EATON, P. et al. Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Ultramicroscopy**, v. 108, n. 10, p. 1128-1134, 2008.

EL-GARHY, O.H. An Overview Of The Azoles Of Interest. **International Journal of Current Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 1, p. 1-6, 2015.

ESTERRE P, QUEIROZ-TELLES F. Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. **Current Opinion in Infectious Diseases**. V.19, p. 148–152. 2006.

ESTERRE, P. et al. Treatment of chromomycosis with terbinafine: preliminary results of an open pilot study. **British Journal of Dermatology**, v. 134, n. s46, p. 33-36, 1996.

ESTERRE, P.; ANDRIANTSIMAHAVANDY, A.; RAHARISOLO, C. [Natural history of chromoblastomycosis in Madagascar and the Indian Ocean][Natural history of chromoblastomycosis in Madagascar and the Indian Ocean]. **Bulletin de la Societe de pathologie exotique (1990)**, v. 90, n. 5, p. 312-317, 1997.

GHANNOUM, M.A.; RICE, L.B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 501-517, 1999.

GOMES, M.H.R., e RESENDE, M.A. *Fonsecaea pedrosoi*: lipid composition and determination of susceptibility to amphotericin B. **Canadian journal of microbiology**, v.38, n.3, p. 209-214, 1992.

GOMES, R.R. et al. Molecular epidemiology of agents of human chromoblastomycosis in Brazil with the description of two novel species. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 11, p. e0005102, 2016.

GUBBINS P.A.E. Overview of Antifungal Agents. **Pharmacy Practice News**. special edition; 2006.

GUIMARÃES, M.A. et al. Anthelmintic activity *in vivo* of epiisopiloturine against juvenile and adult worms of *Schistosoma mansoni*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 3, p. e0003656, 2015.

HARISH C. P., SANTOS H.K.K.K. Cryptolepine a plant alkaloid, inhibits the growth of nonmelanoma skin cancer cells through inhibition of topoisomerase and induction of DNA damage [abstract]. **Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting**. 2017.

HOWDEN, B.P. et al. Successful control of disseminated *Scedosporium prolificans* infection with a combination of voriconazole and terbinafine. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 22, n. 2, p. 111-113, 2003.

KAMIYA, A. et al. PCR and PCR-RFLP techniques targeting the DNA topoisomerase II gene for rapid clinical diagnosis of the etiologic agent of dermatophytosis. **Journal of dermatological science** v.34, n.1, p. 35-48, 2004.

KANBE, T. et al. Rapid and specific identification of *Sporothrix schenckii* by PCR targeting the DNA topoisomerase II gene. **Journal of Dermatological Science**, v. 38, n. 2, p. 99-106, 2005.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604, 2011.

KRZYŚCIAK, P.M.; PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA, M.; PIASZCZYŃSKI, M. Chromoblastomycosis. **Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii**, v. 31, n. 5, p. 310, 2014.

LEITE, J.R.S.A. et al. Processo de obtenção da epiisopiloturina e sua aplicação no combate à infecções parasitárias. **BR PI0904110-9**, 2011.

LI, Y., WAN, Z., & LI, R. *In vitro* activities of nine antifungal drugs and their combinations against *Phialophora verrucosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n.9, p. 5609-5612, 2014.

MEDOFF, G.; COMFORT, M.; KOBAYASHI, G. S. Synergistic action of amphotericin B and 5-fluorocytosine against yeast-like organisms. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 138, n. 2, p. 571-574, 1971.

MELO, C. et al. A compatibility study of the prototype epiisopiloturine and pharmaceutical excipients aiming at the attainment of solid pharmaceutical forms. **Journal of Thermal Analysis & Calorimetry**, v. 120, n. 1, 2015

MINOTTO R. et al. Chromoblastomycosis: a review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Journal of the American Academy of Dermatology** v. 44, p. 585–92, 2001.

MIURA, L.M.C.V. **Isolamento do alcalóide epiisopiloturina a partir da biomassa do Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) e avaliação de suas atividades antibacteriana, antileishmania, antiviral, antiesquistosoma e sialagoga**. Dissertação (Programa de Pós-graduação em ciência animal). Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, p. 123, 2009.

NAJAFZADEH, M. J. et al. *Fonsecaea nubica* sp. nov, a new agent of human chromoblastomycosis revealed using molecular data. **Medical Mycology**, v. 48, n. 6, p. 800-806, 2010.

NAKAJIMA, R. et al. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of DU-6859a, a fluoroquinolone, in combination with amphotericin B and fluconazole against pathogenic fungi. **Antimicrobial agents and chemotherapy** v. 39, n.7, p. 1517-1521, 1995.

NEGRONI, R. et al. Posaconazole treatment of refractory eumycetoma and chromoblastomycosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 6, p. 339-346, 2005.

NOZAWA, Y., et al. **Molecular mechanisms of antifungal agents associated with membrane ergosterol**. *In Vitro and In Vivo Evaluation of Antifungal Agents* (Iwata, K. and Vanden Bossche, H., ed.) p. 111-122, 1986.

PAL, H.C.; KATIYAR, S.K. Cryptolepine a plant alkaloid, inhibits the growth of nonmelanoma skin cancer cells through inhibition of topoisomerase and induction of DNA damage. **Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting**. 2017.

PEDER, L.D. de. Anticorpos monoclonais dirigidos a antígenos lipídicos estágio-específicos de formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. 2006.

PETROU, M. A.; ROGERS, T. R. In-vitro activity of antifungal agents in combination with four quinolones. **Drugs Under Experimental and Clinical Research**, v. 14, n. 1, p. 9-18, 1988.

PORTO, D.J. **Ocorrência de cromoblastomicose em pacientes submetidos a exames micológicos no Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM) em Porto Velho, Rondônia, Brasil**. 2016.

QUÉDRAOGO, M. S. et al. Chromomycosis acquired in a non-tropical area: A case report. In: **Annales de dermatologie et de venerologie**. p. 438-442, 2017.

QUEIROZ-TELLES, F. et al. Chromoblastomycosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 30, n. 1, p. 233-276, 2017.

QUEIROZ-TELLES, F. et al. Itraconazole in the treatment of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*. **International journal of dermatology**, v. 31, n. 11, p. 805-812, 1992.

QUEIROZ-TELLES, F. et al. Mycoses of implantation in Latin America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Medical mycology**, v. 49, n. 3, p. 225-236, 2011.

QUEIROZ-TELLES, F. Chromoblastomycosis: a neglected tropical disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, p. 46-50, 2015.

RANA, A.K.; MISRA-BHATTACHARYA, S. Current drug targets for helminthic diseases. **Parasitology research**, v. 112, n. 5, p. 1819-1831, 2013.

REGUERA, R.M. et al. DNA Topoisomerases as Promising Targets for Leishmania Chemotherapy. In: **Drug Discovery for Leishmaniasis**. p. 348-370, 2017.

REVANKAR SG, SUTTON DA. Melanized fungi in human disease. **Clin. Microbiol. Rev.** 23:884–928. 2010.

RIPPON, J. W. et al. **Medical mycology; the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes**. Eastbourne, UK; WB Saunders Company, 1982.

RYDER, N.S.; FAVRE, B. Antifungal activity and mechanism of action of terbinafine. **Reviews in Contemporary Pharmacotherapy**, v. 8, p. 275-288, 1997.

RYDER, N.S.; LEITNER, I. Synergistic interaction of terbinafine with triazoles or amphotericin B against *Aspergillus* species. **Medical Mycology**, v. 39, n. 1, p. 91-95, 2001.

SANTOS, A.P.; MORENO, P.R.H. *Pilocarpus* spp.: A survey of its chemical constituents and biological activities. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p. 116-137, 2004.

SHEN, L.L. et al. DNA topoisomerases from pathogenic fungi: targets for the discovery of antifungal drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 12, p. 2778-2784, 1992.

SILVA, V.G. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of epiisopiloturine, an imidazole alkaloid isolated from *Pilocarpus microphyllus*. **Journal of natural products**, v. 76, n. 6, p. 1071-1077, 2013.

SILVA-ROCHA, W.P. et al. Clinical improvement of chromoblastomycosis refractory to itraconazole successfully treated with high dose of terbinafine. **The Journal of dermatology**, v. 40, n. 9, p. 775-776, 2013.

SRINIVAS, S.M. et al. Chromoblastomycosis associated with bone and central nervous involvement system in an immunocompetent child caused by *Exophiala spinifera*. **Indian Journal of Dermatology**, v. 61, n. 3, p. 324, 2016.

SVETAZ, L.A. et al. Antifungal drugs combinations: a patent review 2000-2015. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 26, n. 4, p. 439-453, 2016.

TANUMA, H. et al. Case Report. A case of chromoblastomycosis effectively treated with terbinafine. Characteristics of chromoblastomycosis in the Kitasato region, Japan Fallbericht. Ein wirksam mit Terbinafin behandelte Chromoblastomykose-Fall. Charakteristika der Chromoblastomykose in Kitasato, Japan. **MYCOSES-BERLIN**, v. 43, n. 1/2, p. 79-83, 2000.

TORRES-GUERRERO, E. et al. Chromoblastomycosis. **Clinics in dermatology**, v. 30, n. 4, p. 403-408, 2012.

UNGPAKORN, R.; REANGCHAINAM, S. Pulse itraconazole 400 mg daily in the treatment of chromoblastomycosis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 31, n. 2, p. 245-247, 2006.

VANGDAL, M.; BERGAN, T. *In vitro* synergistic activity of norfloxacin and amphotericin-B against fungi. **Drugs Under Experimental and Clinical Research**, v. 10, n. 7, p. 443-444, 1984.

VERAS, L.M. et al. Activity of epiisopiloturine against *Schistosoma mansoni*. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 13, p. 2051-2058, 2012.

VERAS, L.M.C et al. Industrial scale isolation, structural and spectroscopic characterization of epiisopiloturine from *Pilocarpus microphyllus* Stapf leaves: A promising alkaloid against schistosomiasis. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e66702, 2013.

VITALE, R.G. et al. *In vitro* activity of amphotericin B and itraconazole in combination with flucytosine, sulfadiazine and quinolones against *Exophiala spinifera*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 5, p. 1297-1300, 2003.

WALSH, T.J.; LEE, J.W. Prevention of invasive fungal infections in patients with neoplastic diseases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 17, n. Supplement_2, p. S468-S480, 1993.

WEN, Si-Qi et al. Discovery of novel berberine imidazoles as safe antimicrobial agents by down regulating ROS generation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 12, p. 2768-2773, 2016.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse trabalho objetivou avaliar o potencial antifúngico dos alcaloides extraídos das folhas do *Pilocarpus microphyllus*. Para tal, um rastreamento da susceptibilidade de diferentes gêneros de fungos frente a pilocarpina e aos demais alcaloides da biomassa foi realizado. Além disso, foi feita uma análise da atuação da epiisopiloturina em isolados de agentes da cromoblastomicose. O efeito da interação da pilocarpina e da epiisopiloturina com agentes antifúngicos também foi analisado.

Devido à similaridade entre os alcaloides do jaborandi e antifúngicos imidazólicos, estes compostos poderiam apresentar atividade antifúngica. A pilocarpina, apesar de ser um fármaco utilizado comercialmente, é pouco explorado quando ao seu potencial antimicrobiano em geral. Este alcaloide mostrou atividade antifúngica para um agente da cromoblastomicose, e potente atividade sinérgica quando em associação com a terbinafina em diferentes gêneros, em especial para agentes da ceratite filamentosa fúngica. Seu sinergismo nestes últimos agentes se mostra promissor para a terapia, dado que a pilocarpina também agiria em outros aspectos decorrentes da infecção ao passo que potencializa o efeito da terbinafina e até mesmo previne o aparecimento de resistência.

Dentre os alcaloides encontrados na biomassa gerada pela extração da pilocarpina, a epiisopiloturina é o composto em maior quantidade. Como um rastreamento da susceptibilidade fúngica frente a este alcaloide tinha sido avaliado, analisamos o efeito da combinação deste alcaloide com diferentes antifúngicos frente a isolados da cromoblastomicose, uma doença que é o principal tema estudado pelo nosso grupo de pesquisa – GEAMICOL, e que até hoje não se tem um tratamento padrão. A epiisopiloturina se mostrou promissora para o uso na terapia de combinação. Um possível mecanismo para sua ação sinérgica nas células fúngicas foi também sugerido, o que dá início a pesquisas que visam elucidar de maneira concreta este mecanismo. As atividades obtidas com os alcaloides oriundos das folhas do jaborandi abrem portas para pesquisas na terapia antifúngica, onde o potencial dessas combinações (assim como de outras) pode e deve ser explorado.

7. PERSPECTIVAS

- Analisar o efeito da interação cloridrato de pilocarpina/terbinafina sobre a cepa *Fonsecaea pedrosoi* ATCC 46422
- Analisar o efeito da interação cloridrato de pilocarpina/terbinafina para outros isolados fúngicos de *Aspergillus fumigatus*.
- Analisar o efeito da interação cloridrato de pilocarpina/terbinafina para isolados fúngicos de *Fusarium* spp.
- Analisar as alterações morfológicas por microscopia de força atômica para a combinação cloridrato de pilocarpina/terbinafina, bem como destes compostos isoladamente para a cepa *Aspergillus fumigatus* ATCC 13073.
- Analisar as alterações morfológicas por microscopia de força atômica para os antifúngicos isolados (Posaconazol, Terbinafina e Itraconazol) em *Fonsecaea pedrosoi* ATCC 46428.
- Realizar a docagem molecular da epiisopiloturina com as topoisomerasas I e II.