



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
E BIOLOGIA MOLECULAR

MEIRE ANE COSTA MIGUEL

**Estudo dos óleos naturais frente à *Paracoccidioides* spp.: atividade biológica de
óleos de copaíba *in natura* e imobilizado em micelas**

Orientadora Dra. Maristela Pereira

Goiânia –GO

2017

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Meire Ane Costa Miguel

Título do trabalho: Estudo dos óleos naturais frente à *Paracoccidioides* spp.: atividade biológica de óleos de copaíba *in natura* e imobilizado em micelas.

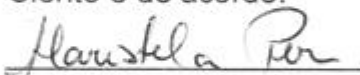
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ **SIM** ☐ **NÃO**¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 04 / 04 / 19

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

MEIRE ANE COSTA MIGUEL

**Estudo dos óleos naturais frente à *Paracoccidioides* spp.: atividade biológica de
óleos de copaíba *in natura* e imobilizado em micelas**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Genética e
Biologia Molecular da
Universidade Federal de
Goiás para obtenção do Título
de Mestre em Genética e
Biologia Molecular.

Orientadora: Dra. Maristela
Pereira

Goiânia –GO

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Costa Miguel, Meire Ane

Estudo dos óleos naturais frente à Paracoccidioides spp.:
atividade biológica de óleos de copaíba in natura e imobilizado em
micelas [manuscrito] / Meire Ane Costa Miguel. - 2017.
LXXVIII, 78 f.

Orientador: Profa. Dra. Maristela Pereira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto
de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em
Genética e Biologia Molecular, Goiânia, 2017.

Bibliografia. Apêndice.

Inclui abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Paracoccidioides spp.. 2. compostos naturais. 3. óleos .
4. micela. 5. antifúngicos. I. Pereira, Maristela, orient. II. Título.

CDU 575



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nº 052

Aos dez dias do mês de Agosto do ano de dois mil e dezessete (10/08/2017), às 14hs00min, no (a) Anfiteatro do ICB IV, reuniram-se os componentes da banca examinadora: **Profa. Dra. Maristela Pereira, Profa. Dra. Maria Cecília Alves de Oliveira e Prof. Dr. Clayton Luiz Borges** para, em sessão pública presidida pela primeira examinadora citada, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **"Atividade antifúngica de óleos naturais extraídos de *Carapa spp.*, *Copaifera langsdorffii*, *Pterodon spp.*, látex de *Himatanthus spp.*, *Copaifera langsdorffii* imobilizada em micelas e β -Cariofileno contra *Paracoccidioides spp.*",** em nível de mestrado, área de concentração em **Genética e Biologia Molecular**, de autoria de **Meire Ane Costa Miguel**, discente do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela presidente, que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra, a seguir, foi concedida à autora da dissertação que, em cerca de 40 minutos, procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu a examinada, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da dissertação. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº 1294/2014 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, a dissertação foi Aprovada, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega da versão definitiva da dissertação na secretaria do programa, com as



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

devidas correções sugeridas pela banca examinadora, no prazo de trinta dias a contar da data da defesa. Cumpridas as formalidades de pauta, às 16 horas e 30 minutos, encerrou-se a sessão de defesa e, para constar, eu, Gleizilene Braz Pereira dos Santos, Assistente em Administração do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Goiás, lavrei a presente ata que, após lida e aprovada, será assinada pelos membros da banca examinadora em três vias de igual teor.


Prof. Dra. Maristela Pereira
Presidente da Banca
UFG/GO


Prof. Dra. Maria Cecília Alves de Oliveira
UFG/GO


Prof. Dr. Clayton Luiz Borges
UFG/GO



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 52

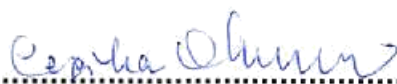
TÍTULO DO TRABALHO: "**Atividade antifúngica de óleos naturais extraídos de *Carapa spp.*, *Copaifera langsdorffii*, *Pterodon spp.*, látex de *Himatanthus spp.*, *Copaifera langsdorffii* imobilizada em micelas e β -Cariofileno contra *Paracoccidioides spp.***".

AUTOR (A): Meire Ane Costa Miguel.

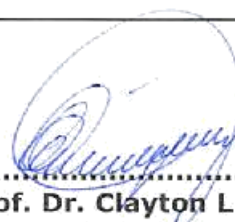
DISSERTAÇÃO Nº 052 DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR, DEFENDIDA E APROVADA EM SESSÃO PÚBLICA, NA DATA DE 10 de Agosto DE 2017, ÀS 14hs00min, NO (A) ANFITEATRO DO ICB IV DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UFG, CUJA BANCA EXAMINADORA ESTEVE CONSTITUÍDA DOS SEGUINTE PROFESSORES:

.....


Profa. Dra. Maristela Pereira
Universidade Federal de Goiás

.....


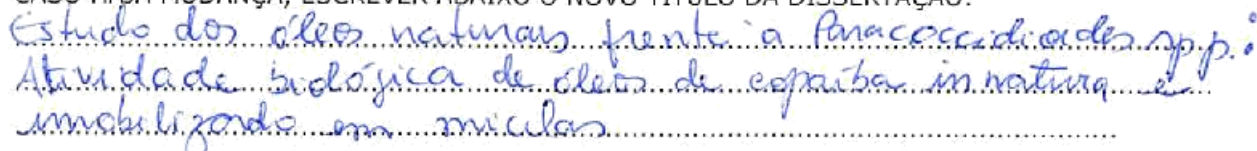
Profa. Dra. Cecília Maria Alves de Oliveira
Universidade Federal de Goiás

.....


Prof. Dr. Clayton Luiz Borges
Universidade Federal de Goiás

HOUVE MUDANÇA NO TÍTULO? SIM(X) NÃO ()

CASO HAJA MUDANÇA, ESCREVER ABAIXO O NOVO TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

.....

.....

OBS: O título na dissertação impressa deve corresponder exatamente ao que se encontra na ata.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
E BIOLOGIA MOLECULAR

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

Aluna: Meire Ane Costa Miguel

Orientadora: Dra. Maristela Pereira

Membros

Dr. Clayton Luiz Borges - Instituto de Ciências Biológicas II - UFG Dra. Cecília

Maria Alves de Oliveira - Instituto de Química - UFG

Suplentes

Dra. Lucília Kato - Instituto de Química –UFG

Dra. Patrícia Fernanda Zambuzzi Carvalho

Data:
10.08.2017

Agradecimentos

A Deus pelo amor, misericórdia e benção que tem dado em toda a minha vida.

Aos meus pais Gilnei Luiz Miguel e Janete Divina Cândida da Costa e Silva Miguel que sempre me deram amor, carinho, atenção e apoio em todos os momentos de minha vida.

Ao José Arantes Ferreira Júnior pelo aprendizado, me mostrando a importância da pesquisa. Obrigada pelo apoio e incentivo a entrar neste grupo seleto de pesquisadores. Obrigada a Terezinha Maria Silva Ferreira e toda a família Ferreira que me deram todo tipo de suporte no momento que precisei, que o Senhor abençoe esta família.

Ao meu esposo João Pedro de Miranda Neto pelo apoio, amor e carinho. Obrigada por sempre estar por perto e pelos momentos prazerosos de leitura. O meu desejo é que possamos continuar com nossos projetos juntos, trabalhando para a obra de Cristo e contribuindo para a edificação de sua Igreja.

A Livia do Carmo Silva obrigada por ter me recebido como parte da família em sua casa, pelo apoio, ensinamentos, companheirismo em todos os momentos que corroboraram para a produção deste trabalho, sobretudo por sua amizade.

Aos amigos, Andrea Leite, Amanda Alves, Isabela Silva, Juliana Decurcio, Julianna Veiga, Kleber Santiago, Marielle Garcia, Raisal Melo, Sheila Sestari, Thaylla Horbylon, Victória Albernaz e Wanderson da Costa obrigada pela parceria e apoio neste período de mestrado.

A orientadora Dra. Maristela Pereira por ter me aceitado como aluna, confiando este seu projeto para que eu pudesse desenvolvê-lo. Obrigada pela orientação e apoio neste período.

A todos os professores e alunos que me receberam e me ajudaram de alguma forma no laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBM).

SUMÁRIO

Lista de figuras	VII
Lista de tabelas	VIII
Lista de abreviaturas	IX
Resumo	1
Abstract.....	2

CAPÍTULO I: Considerações Gerais

1. Introdução

1.1. O gênero <i>Paracoccidioides</i> e a Paracoccidioidomicose (PCM)	4
1.2. Compostos naturais	9
1.2.1. O gênero <i>Copaifera</i>	10
1.2.2. O gênero <i>Pterodon</i>	11
1.2.3. O gênero <i>Carapa</i>	12
1.2.4. O gênero <i>Himatanthus</i>	13
1.3. Nanotecnologia e desenvolvimento de novos fármacos	13
1.4. Encapsulação em micela	14
2. Justificativas	17
3. Objetivo Geral.....	18
3.1 Objetivos específicos	18

CAPÍTULO II

Manuscrito: Antifungal activity of the oil extracted from <i>Copaifera</i> spp., <i>Copaifera</i> spp. oil in Pluronic [®] F-127 micelle and β -Caryophyllene on <i>Paracoccidioides</i> spp.....	19
--	----

CAPÍTULO III

Atividade antifúngica de óleos extraídos de <i>Pterodon</i> spp., <i>Carapa</i> spp. e látex de <i>Himatanthus</i> spp. em <i>Paracoccidioides</i> spp.	36
--	----

CAPÍTULO IV:

Considerações Finais	43
4. Conclusão.....	46
5. Perspectivas.....	47
6. Referências.....	48

Lista de figuras:

Figura 1. Imagem microscópica das formas de <i>Paracoccidioides</i> spp.....	5
Figura 5. Sistema de liberação de um nanofármaco multifuncional	14
Figura 6. Formação do copolímero de Pluronic [®] F-127	16

Lista de tabelas:

Tabela I. Atividade biológica do óleo de andiroba, sucupira e látex de janaúba.....62

Tabela II. Percentual da atividade hemolítica do óleo
sucupira..... 62

Tabela III. Interação *in vitro* de sucupira com anfotericina B, sulfametoxazol +
trimetoprima (SXT) e itraconazol em *Paracoccidioides*
spp..... 62

Listas de abreviaturas

AChE: Acetilcolinesterase

CC: Concentração citotóxica

CIF: Concentração inibitória fracionada

CIM: Concentração inibitória mínima

CFM: Concentração fungicida mínima

CL: Concentração Larvicida

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's médium*

EBP: *Estradiol Binding Protein*

FIC: *Fractional inhibitory concentration*

IS: Índice de seletividade

PAS: *Periodic acid-Schiff*

PCM: Paracoccidioidomicose

POE: Poli óxido de etileno

POP: Poli óxido de propileno

SNPs: *Single nucleotide polymorphisms*

SNC: Sistema nervoso central SXT:

Sulfametoxazol- trimetoprima

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute medium*

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DMSO: Dimetilsulfóxido

CFU: *Colony forming unit*

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido

NAPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

ÓLEO-MICELA: Óleo copaíba imobilizada Pluronic[®] F-127 em micela

Resumo:

Os óleos naturais agregam valores terapêuticos e são comumente utilizados como fitoterápicos. O óleo de copaíba, sucupira, andiroba e o látex de janaúba, têm sido extraídos de árvores nativas Brasileiras e utilizados contra diversos patógenos. Neste trabalho utilizamos os óleos naturais, tais como, o látex de janaúba e o composto β -cariofileno contra *Paracoccidioides* spp.. Este gênero corresponde a fungos filamentosos causadores da micose sistêmica Paracoccidioidomicose (PCM) com registros na América Latina, cujo maior número de casos estão no Brasil. À partir destes compostos foi determinado a citotoxicidade em células Balb/c 3T3 e para os óleos que inibiram o crescimento fúngico, a interação com os antifúngicos anfotericina B, sulfametoxazol-trimetoprima (SXT) e itraconazol foram avaliadas. Em adição o óleo copaíba encapsulado em micela Pluronic[®] F-127 (óleo-micela) um composto promissor, ainda não elucidado em *Paracoccidioides* spp. foi também testado. A concentração inibitória mínima (CIM) e a citotoxicidade dos compostos foram evidenciados pela técnica de microdiluição. A concentração mínima fungicida (CFM) foi determinada pelo crescimento em placa pela técnica *checkerboard*, utilizada para analisar a interação dos óleos com os agentes antifúngicos. O óleo copaíba, óleo-micela e sucupira exibiram atividade fungicida com valores de CIM de 62,5 μ g/mL, 125 μ g/mL e 250 μ g/mL respectivamente. O óleo de andiroba, o látex-janaúba e β -cariofileno não inibiram o crescimento de *Paracoccidioides* spp. nas concentrações testadas. O óleo de copaíba, sucupira e o óleo- micela não apresentaram atividade hemolítica significativa e citotoxicidade nas células Balb/c 3T3 nas concentrações de CIM. A combinação de anfotericina B foi sinérgica com o óleo copaíba e o óleo-micela, apresentando concentração inibitória fracionada de 0,75. O óleo copaíba e o óleo-micela mostraram-se promissores para auxiliar no tratamento da PCM, pois inibem o crescimento do fungo e não apresentam efeitos citotóxicos nem hemolíticos. Além disso, o óleo de copaíba e o óleo-micela em combinação com a anfotericina B demonstraram atividade aditiva, enquanto que o óleo de sucupira não teve atividade sinérgica.

Palavras chave: *Paracoccidioides* spp., compostos naturais, óleos, micela, antifúngicos.

Abstract:

Natural oils add therapeutic values and are commonly used as herbal medicines. Copaiba oil, sucupira and andiroba, the janauba latex, have been extracted from native Brazilian trees and have been used against various pathogens. In this work we used natural oils, such as caryophyllene-latex and janauba compound against *Paracoccidioides* spp.. This genus corresponds to filamentous fungi that cause systemic mycosis Paracoccidioidomycosis (PCM) with records in Latin America, with the highest number of cases they are in Brazil. From these compounds it was determined on the cytotoxicity in Balb/c 3T3 cells and for the oils that had inhibited the growth fungal interaction with the antifungal agents amphotericin B, sulfamethoxazole-trimethoprim (SXT) and itraconazole were evaluated. In addition, the copaiba oil encapsulated in Pluronic[®] F-127 micelle (oil-micelle) is a promising compound, not yet elucidated in *Paracoccidioides* spp. was also tested. The minimal inhibitory concentration (MIC) and the cytotoxicity of the compounds were evidenced by the microdilution technique. The minimum fungicidal concentration (MFC) was determined by the growth in plaque by the checkerboard technique was used to assay the interaction of the oils with the antifungal agents. Copaiba, oil-micelle and sucupira oil exhibited fungicidal activity with MIC values of 62.5/mL, $\mu\text{g}125/\text{mL}\mu\text{g}$ and $/\text{mL},250\text{respectively}\mu\text{g}$. Andiroba oil, janaúba -latexcaryophyllene anddidnot inhibit β the growth of *Paracoccidioides* spp. at the concentrations tested. Copaiba, sucupira and oil-micelle showed no significant hemolytic activity and cytotoxicity in the Balb/c 3T3 cells at MIC concentrations. The combination of amphotericin B was synergistic with copaiba oil and oil-micelle, having a fractional inhibitory concentration of 0.75. Copaiba oil and oil-micelle have been shown to be promising for the treatment of PCM, as they inhibit fungal growth and have no cytotoxic or hemolytic effects. In addition, copaiba oil and oil-micelle in combination with amphotericin B demonstrated additive activity, whereas sucupira oil had no synergistic activity.

Keywords: *Paracoccidioides* spp., natural compounds, oils, micelle, antifungal.

CAPÍTULO I

Considerações Gerais

1. Introdução

1.1. O gênero *Paracoccidioides* e a Paracoccidioidomicose (PCM)

Mundialmente, devido aos altos índices de morbidade e mortalidade, as infecções fúngicas têm sido uma preocupação na saúde pública. Este problema se agrava quando micro-organismos patogênicos atingem os grupos de alto risco, especialmente os pacientes imunologicamente comprometidos. Estima-se que anualmente, cerca de 1,2 bilhões de pessoas são infectadas por fungos patogênicos (Denning & Bromley, 2015).

A PCM, é uma micose restrita à América Latina, foi descoberta por Adolf Lutz em 1908, sendo inicialmente conhecida como Blastomicose Sul-Americana ou doença de Lutz-Splendore-Almeida (Martinez, 2015). Os agentes etiológicos da PCM são fungos pertencentes ao gênero *Paracoccidioides*, o qual compreende duas espécies, com ocorrência restrita às áreas geográficas da Argentina, Brasil, Peru, Paraguai e Venezuela: (1) *Paracoccidioides brasiliensis*, formado por um complexo de quatro grupos filogenéticos S1, recentemente subdividida nas linhagens S1a e S1b (Muñoz *et al.*, 2016), PS2, PS3 e PS4, e (2) *Paracoccidioides lutzii*, ocorre na região central e norte do Brasil (Teixeira *et al.*, 2014). No Brasil, o fungo é frequentemente encontrado nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (Martinez *et al.*, 2015).

Paracoccidioides spp. são fungos dimórficos, apresentando sob a forma de micélio ou levedura. A temperatura é o principal influenciador do dimorfismo. Assim, *in vitro* entre a temperatura de 35°C a 37°C ou no hospedeiro, é possível observar a forma de levedura. As células leveduriformes mães são circundadas por células filhas menores, dando a aparência de “-leme” “roda” (Lacaz, 1993). Em temperatura de 22°C-25°C, a forma micelial apresenta conídios intercalares e hifas septadas, os quais podem ser inalados pelo hospedeiro causando infecção (Restrepo *et al.*, 2001). As formas leveduriforme e micelial estão mostradas na figura 1.

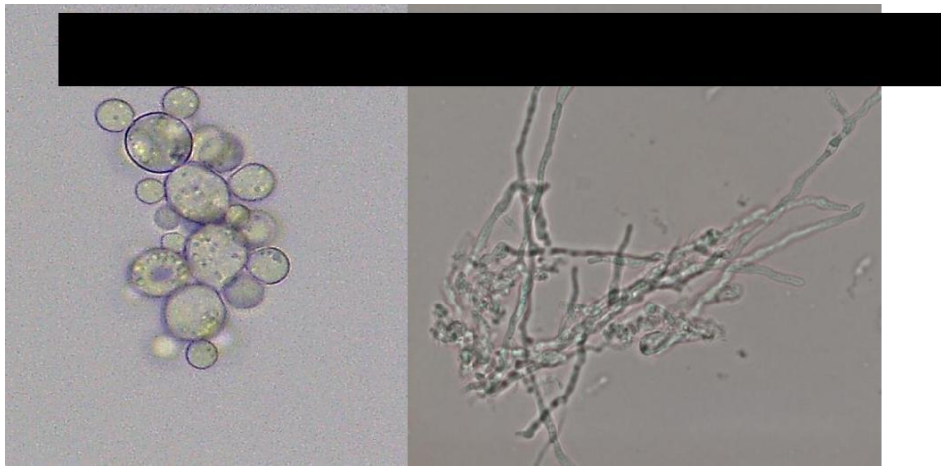


Figura 1. Imagem microscópica das formas de *Paracoccidioides* spp.. A) Fase leveduriforme, aumento 40X. B) Fase micelial, aumento 100X. Ambas as células foram coradas com tripan.

Outros fatores estão associados ao dimorfismo de *Paracoccidioides* spp., dentre eles, o hormônio 17- β -estradiol. Esse hormônio inibe a transição morfológica do fungo, processo essencial para o estabelecimento da infecção. Estudos *in vitro* demonstraram que na presença de estrógeno a transição morfológica de *P. brasiliensis* é inibida dose-dependente (Restrepo *et al.*, 1984). Além disso, 17- β -estradiol modula a expressão de genes relacionados à resposta ao choque térmico, manutenção e remodelação da parede celular, metabolismo energético e sinalização celular durante a transição morfológica (Aristizábal *et al.*, 2002; Aristizabal *et al.*, 1998). Estudos indicam que a baixa incidência da PCM em mulheres na fase adulta está relacionado à produção do hormônio 17- β -estradiol durante o período reprodutivo, que se liga com alta afinidade e especificidade à proteína EBP (*Estradiol Binding Protein*) do fungo, inibindo assim sua disseminação no hospedeiro (Loose *et al.*, 1983; Restrepo, 1985).

O processo de transição morfológica de *Paracoccidioides* spp. tem sido alvo de estudos para elucidação de vias importantes para este processo. Abordagens proteômicas foram usadas para caracterizar proteínas expressas em suas formas morfológicas e após a interação com macrófagos. Durante a transição morfológica, várias proteínas envolvidas no metabolismo de aminoácidos, nitrogênio, transdução de sinal e relacionadas ao choque térmico, como HSP88, HSP90 e HSP70, foram altamente expressas (Rezende *et al.*, 2011). Além disso, as análises transcricionais revelaram a indução de genes relacionados à remodelação da parede celular e membrana (Felipe *et al.*, 2005; Bastos *et al.*, 2007; Parente *et al.*, 2008).

Apesar do nicho ecológico de *Paracoccidioides* spp. não ter sido definitivamente elucidado, evidências sugerem que o fungo viva saprofobioticamente na natureza, preferencialmente em ambiente úmido, em áreas subtropicais da América Central e do Sul, onde as temperaturas médias anuais variam de 18 °C a 24 °C e índices pluviométricos são elevados (Lacaz *et al.*, 2002; Bagagli *et al.*, 2008). Além disso, sugere que o solo seja um elemento importante na ecologia do patógeno devido aos isolamentos constantes do fungo neste ambiente (Terçarioli *et al.*, 2007) e que algumas espécies de animais domésticos e selvagens podem estar envolvidos na ecoepidemiologia da PCM, já que o fungo foi isolado, por exemplo, em pinguins (Garcia *et al.*, 1993), tatus (Silva-Vergara *et al.*, 2000; Corredor *et al.*, 2005), cachorros (Ricci *et al.*, 2004; Farias *et al.*, 2011) e primatas (Corte *et al.*, 2007).

A PCM acomete principalmente trabalhadores rurais residentes em áreas endêmicas, entre 30 a 50 anos de idade e do sexo masculino (Londero & Ramos, 1990; Blotta *et al.*, 1999; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006; Marques *et al.*, 2007). Assim, devido ao seu caráter incapacitante, a doença causa um grande impacto social, pois em idade de alta produtividade, os trabalhadores precisam se ausentar por um longo período de tempo para realizar o tratamento da PCM, por isso esta doença tem se tornado um problema para a saúde pública (Mendes *et al.*, 2003; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

A incidência anual de PCM em áreas rurais endêmicas varia entre 1-3 novos casos/100.000 habitantes, sendo considerada a terceira maior causa de morte por doença infecciosa crônica (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). Dentre os países endêmicos da PCM, destaca-se o Brasil, o qual responde por 80% dos casos ativos, especialmente nas regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste, onde a incidência anual é de 10 a 30 casos por 1.000.000 de habitantes (Coutinho *et al.*, 2002; Sifuentes-Osornio *et al.*, 2012). Na região Sul, no período de 1966 a 2005 foram registrados 1041 casos (Martinez, 2015), sendo registrado no Paraná de 1980 a 1998 551 mortes por PCM e 102 casos de 2008 a 2009 (Bittencourt *et al.*, 2005; Loth *et al.*, 2011). Na região Centro-Oeste, 2509 casos foram registrados em 1968 a 2013 (Martinez, 2015). Em Goiás, em um estudo restrito a um hospital universitário de 2000 a 2006 foram diagnosticados 77 casos de PCM (Ferreira *et al.*, 2012). De 1980 a 1999 foram evidenciados 422 casos no estado de Mato Grosso do Sul (Paniago *et al.*, 2003) e de 1960 a 1999, em São Paulo, 1000 casos foram descritos (Bellissimo-Rodrigues *et al.*, 2011). Devido ao desmatamento de áreas a serem utilizadas na pecuária, agricultura e expansão, o surgimento de novos casos em regiões antes não conhecidas como endêmicas, como Amazônia ocidental (Martinez,

2015). De 1997 a 2012, 163 casos de PCM foram registrados em Rondônia (Vieira *et al.*, 2014).

A contaminação por *Paracoccidioides* spp. ocorre principalmente pelas vias aéreas, através da inalação dos esporos fúngicos produzidos pela forma miceliana, atingindo os pulmões (San-blas *et al.*, 2002). Ao entrar em contato com as células do hospedeiro à 37°C, o fungo transita para a forma de levedura. Nesse ambiente, os genes do fungo são regulados de modo a induzir a expressão de proteínas importantes para a adaptação metabólica, estresse e fatores de virulência, assim, o fungo consegue se adaptar e causar a infecção (Felipe *et al.*, 2005; Borges *et al.*, 2011). Caso os esporos resistam à barreira imunológica, podem disseminar através da corrente sanguínea ou linfática, acometendo outros órgãos e sistemas como fígado, baço, ossos e sistema nervoso central (Valera *et al.*, 2008).

Dependendo das manifestações clínicas, a PCM podem se apresentar sob as formas regressiva, aguda/subaguda, crônica ou residual. A caracterização do estágio da doença irá depender da idade do paciente, da resposta imune celular, da carga fúngica inalada, da presença de outras doenças relacionadas e dos sintomas apresentados. A contaminação inicial pode ser de forma assintomática ou apresentar sintomas como tosse, febre, astenias, anorexia e dor torácica. Na forma regressiva, o indivíduo se recupera das lesões iniciais e o desenvolvimento progressivo é contido, porém as células podem permanecer em estado latente nos pulmões ou nos linfonodos, podendo se reativar e causar uma nova infecção (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

No estágio progressivo, ocorrem as fases aguda/subaguda e crônica. Na fase aguda/subaguda, também denominada de fase juvenil, crianças e jovens adultos com menos de 30 anos de idade são os mais acometidos, e há uma evolução rápida dos quadros clínicos, comprometendo preferencialmente o sistema monocítico-fagocitário, estendendo a nódulos linfáticos, fígado, baço e medula óssea. A forma crônica predomina em indivíduos adultos de 30 a 64 anos de idade e tem uma evolução lenta e gradual. Devido ao longo período de latência, variando de anos até décadas, os sintomas já aparecem em estágio avançado da doença, apresentando um amplo espectro de manifestações clínicas com lesões predominantes no pulmão e mucosa orofaríngea, podendo também causar lesões granulomatosas no sistema nervoso central (Marques 2003; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006; Queiros-Telles *et al.*, 2011).

A radiografia do tórax, exame histopatológico e de hipersensibilidade à proteína gp43 são utilizados para diagnosticar os casos de PCM. A identificação do fungo

presente em escarro, raspado de lesões ou amostras de órgãos é realizado utilizando colorações como de Grocott-Gomori e PAS (*Periodic acid-Schiff*), que permitem a visualização de formas leveduriformes com múltiplos brotamentos (Guarner & Brandt, 2011). O teste de imunodifusão em duplo gel de ágar é um teste com sensibilidade de 80% e eficácia de 90%, estando disponível na prática clínica, podendo ser utilizado para avaliar a resposta do paciente ao tratamento, tendo em vista que o aumento do número de anticorpos é relacionado com recaída (Do Valle *et al.*, 2001; Wanke & Aidê, 2009).

Apesar de todos os impactos descritos, o Sistema único de saúde (SUS) não exige notificação compulsória de casos de PCM. Poucas pesquisas no desenvolvimento de fármacos são direcionadas à PCM, o que a torna uma doença negligenciada. O cenário se agrava, pois não possui medidas recomendadas para evitar sua contaminação (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). O tratamento é prolongado, podendo estender-se para mais de um ano, suscetível a reincidências, complicações e sequelas, principalmente, a insuficiência respiratória por fibrose pulmonar (Martinez, 2010).

Os fármacos que comumente são utilizados no tratamento contra a PCM pertencem à classe dos polienos (anfotericina B), sulfonamidas (sulfadiazina e a associação trimetoprima-sulfametoxazol (SXT) e azóis, como o itraconazol. Alguns critérios são necessários na escolha do antifúngico, como o grau da lesão, a severidade da doença, contraindicação a algum medicamento baseando-se no histórico prévio de falha do medicamento ou reação de hipersensibilidade (Yasuda, 2005).

Um dos primeiros medicamentos a auxiliar no tratamento foi a combinação de SXT, sugerido em 1973 por Barbosa & Vasconcelos. O tratamento é previsto de dois a três anos com administração de altas concentrações diárias. SXT atua inibindo sequencialmente enzimas envolvidas na síntese de ácido tetrahidrofólico, levando à depleção de folato intracelular, o qual é essencial para o crescimento do organismo patogênico (Haruki *et al.*, 2013). Apesar do custo relativamente baixo e ser disponível na rede pública, seu uso terapêutico é ofuscado pelos efeitos colaterais e toxicidade do medicamento. Além disso, tem se relatado recaídas mesmo antes de completar 6 meses após a retirada da medicação (Shikanai-Yasuda, 2015). Os pacientes que fazem uso da medicação podem apresentar injúria hepática (Kouklakis *et al.*, 2007), comprometimento das funções renais, necrose epidérmica (Wanat *et al.*, 2009), anemia e outras discrasias sanguínea, sendo o agravamento deste efeito colateral pode levar à morte por supressão da medula óssea (Keisu *et al.*, 1990).

O tratamento com anfotericina B tem sido prescrito desde 1958 sendo este o fármaco de escolha para as infecções crônicas mais graves. Esse tratamento é eficiente em infecções viscerais e infecções fúngicas invasivas em pacientes imunocomprometidos, em pacientes intolerantes e organismos resistentes às sulfas (Odds *et al.*, 2003). Este medicamento interrompe o crescimento fúngico, alterando a permeabilidade da membrana celular pela ligação ao ergosterol, levando à formação de poros na membrana celular que permite a saída de íons e de metabólitos presente no citoplasma, consequentemente, ocasionando a morte celular (Beauvais & Latgé, 2001).

As pessoas tratadas com anfotericina B em sua maioria são curadas, porém a utilização deste antifúngico é limitado pela frequência de efeitos colaterais, tais como febre, náuseas, vômitos, dor de cabeça, e taquipnéia (respiração rápida), taquicardia (batimento cardíaco acelerado), hipertensão, hipocalcemia (diminui as concentrações de potássio), diminuição da filtração glomerular e acidose tubular renal, causada pela incapacidade dos rins de acidificar a urina, dentre outros (Laniado-Laborín & Cabrales-Vargas, 2006). Além disso, apresentam taxas elevadas de recaída, 20% a 30% (Mendes *et al.*, 1994). A posologia inicial de 1 mg/Kg/dia, não ultrapassando um total de 25-35 mg/Kg diários em casos graves. Outras formulações menos tóxicas como anfotericina B em dispersão coloidal, a anfotericina lipossomal e o complexo lipídico de anfotericina B são disponíveis, porém são muito mais caras, diminuindo assim sua viabilidade de utilização nos tratamentos (Adler-Moore, 2002; Shikanai-Yasuda, 2015).

Os antifúngicos pertencentes à classe dos azóis, como cetoconazol, itraconazol, fluconazol e voriconazol surgiram na década de 80. Estes fármacos agem na membrana celular inibindo a ação da enzima esterol 14- α -dimetilase, diminuindo a biossíntese do ergosterol situado na membrana plasmática do fungo e altera a permeabilidade da membrana (Yoshida & Aoyama, 1991). Para o tratamento da PCM, altas doses são administradas por longo período, 200 mg/dia por 6-9 meses, causando hepatotoxicidade e efeitos colaterais como náusea, cólica abdominal, diarreia e dores de cabeça aminotranferases, inflamação cutânea, dentre outros distúrbios no metabolismo (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006; Catalán *et al.*, 2006). O tratamento prolongado contribui para que ocorram interações medicamentosas, assim, o uso em conjunto com outros medicamentos é restringido.

1.2. Compostos naturais

Plantas possuem vários mecanismos de defesa contra patógenos, sendo alguns expressos constitutivamente, enquanto outros são ativados por danos celulares, ou produzidos após sinais exógenos. Além das barreiras físicas, como cutícula espessa, ceras na superfície da folha, aumento da espessura e rigidez da parede celular, outras defesas são ativadas para restringir a infecção por patógenos, como a síntese de peptídeos, proteínas e metabólitos secundários. Assim, a presença de compostos ativos em extratos vegetais se deve à formação de metabólitos citotóxicos gerados como um dos mecanismos de defesa da planta (Heath, 2000).

A utilização de plantas para fins terapêuticos possuem registros históricos. As plantas eram indicadas por boticários que atualmente chamamos de farmacêuticos. Extratos vegetais eram utilizados para produzir formulações terapêuticas brutas ou purificados; a partir da década de 80, a química conseguiu o isolamento de moléculas ativas promissoras, possibilitando o desenvolvimento de fármacos sintéticos, semi-sintéticos e análogos aos compostos naturais (Cragg & Newman, 2013).

O Brasil, como país tropical, possui domínios ricos em biodiversidade como a Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Floresta Amazônica e Floresta de Araucária (Basso *et al.*, 2005). Algumas espécies de plantas nas regiões brasileiras produzem óleos naturais, os quais são produtos dos metabólitos secundários utilizados frequentemente pela população. O reconhecimento das propriedades biológicas dos metabólitos secundários tem incentivado a sua investigação como medicamentos, antibióticos, inseticidas e herbicidas. Esses óleos possuem elevada biodisponibilidade tornando-os favoráveis à utilização como fitoterápicos. Dentre os óleos comumente comercializados estão os óleos de copaíba (*Copaifera* spp.), sucupira (*Pterodon* spp.), andiroba (*Carapa* spp.), látex de janaúba (*Himatanthus* spp.) e o β -cariofileno, constituinte do óleo de copaíba.

1.2.1. O gênero *Copaifera*

O gênero *Copaifera* é endêmico da América Latina e África Ocidental, sendo identificadas 72 espécies; no Brasil, estão presentes nas regiões Sudeste, Centro-oeste e Amazônia. São árvores frondosas, grandes produtoras de metabólitos secundários, os quais são armazenados naturalmente em seu tronco visando proteger-se contra animais herbívoros e predadores. O óleo retirado desta planta, popularmente denominada copaíba, é conhecido por muitos brasileiros, por suas propriedades laxativas,

cicatrizantes, diurética, analgésica, anti-inflamatória, antifúngica e antitumoral (Santos *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2008).

O óleo de *Copaifera multijuga* Hayne apresenta atividade fungistática frente aos esporos das cepas de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus tamaraii*, *Aspergillus terreus*, e nas células de *Candida guilliermondii*, *Candida tropicallis* e *Candida parapsilosis*. Estas espécies foram inibidas com taxa acima de 90% mostrando seu potencial terapêutico contra os gêneros de fungos *Aspergillus* e *Candida* (Deus *et al.*, 2009).

A inibição da atividade antimicrobiana na presença do óleo de copaíba investigada por Santos *et al.* (2008) contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, levedura e dermatófitos, resultou na inibição de *Staphylococcus aureus*, resistente à meticilina, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis* (bactérias Gram-positivas).

O óleo de copaíba originado da espécie *Copaifera reticulata* Ducke da região Amazônica é capaz de modular a resposta inflamatória *in vivo*, diminuindo o infiltrado inflamatório crônico e edemas (Teixeira *et al.*, 2017). Outros testes realizados com o óleo de copaíba têm mostrado resultados relevantes que justificam o seu uso como fitoterápico.

O β -cariofileno é um composto sesquiterpeno presente não só no óleo de copaíba, assim como em outros óleos essenciais, incluindo o óleo de sucupira (Alves *et al.* 2013). Este componente possui inúmeras propriedades farmacológicas já descritas como antibacteriana, antiparasitário, antitumoral, larvicida, anti-inflamatória, antioxidante, anestésica (Calleja *et al.*, 2013; Soares *et al.*, 2013; Amiel *et al.*, 2012; Pant *et al.*, 2014; Soares *et al.*, 2013).

1.2.2. O gênero *Pterodon*

O gênero *Pterodon*, conhecido como sucupira branca ou faveira é encontrado na Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal. Cinco espécies compõem este gênero: *Pterodon abruptus* Benth., *Pterodon apparicioni* Pedersoli, *Pterodon emarginatus* Vogel, *Pterodon polygalaeflorus* Benth. e *Pterodon pubescens* Benth (Almeida *et al.*, 1998).

Análises fitoquímicas do óleo extraído da semente de *Pterodon* spp. revelaram alcalóides isoflavonas, diterpenos e triterpenos (Arriaga *et al.*, 2000; Santo *et al.*, 2010).

O óleo de sucupira possui propriedades analgésicas, anti-inflamatórias (Hoscheid & Cardoso, 2015; Galceran *et al.*, 2011), anti-reumáticas, anti-cancerígenas (Dutra *et al.*, 2012), anti-oxidantes, anti-fúngica (Roque *et al.*, 2015) e ainda auxilia no tratamento de doenças autoimunes degenerativas (Hansen *et al.*, 2010). Na planta, os compostos fenólicos contribuem para a resistência e proteção contra patógenos.

Uma nano micela foi obtida por Oliveira & colaboradores (2016, 2017) com o óleo extraído de *P. emarginatus* permitiu a atividade larvicida contra *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. Assim, esses outros estudos mostram que *Pterodon* spp. agrega recursos metabólicos importantes com valores terapêuticos.

1.2.3. O gênero *Carapa*

Carapa é um gênero pertencente à família Meliaceae; são árvores restritas de florestas tropicais da África e América. Na América foram registradas 11 espécies que se estendem desde a Amazônia, Equador, até a América Central. 16 espécies são endêmicas da África. No Brasil é encontrado nos estados do Amapá, Pará, Acre, Amazonas e Maranhão, e predomina-se nas regiões de várzeas e áreas alagáveis ao longo dos igapós, sendo popularmente conhecido como andiroba, andirobinha, andiroba-branca, andiroba do igapó, carapa, jandiroba e penaíba (Ferraz *et al.*, 2002).

As plantas nativas são importantes fontes de renda nas comunidades rurais, e desempenham um importante papel social e cultural (Guèye *et al.*, 2009). Todas as partes da planta têm sido usadas para fins fitoterápicos (Alexandre & Rocha, 2017); no entanto, o óleo extraído a partir de suas sementes é utilizado para curar edemas, reumatismos, anti-inflamatório, antialérgico, auxiliar na cicatrização e serve como matéria prima para indústrias de cosméticos (Fernandes *et al.*, 2014; Henriques & Penido, 2014; Sakamoto *et al.*, 2015; Penido *et al.*, 2006).

O óleo de andiroba é composto por ácidos graxos e outra parte de componentes não saponificáveis, rica em compostos limnóides que podem ser obtidos através do fracionamento por cromatografia. Miranda-Júnior & colaboradores (2012) identificaram os componentes limnóides da espécie *Carapa guianensis*. Neste trabalho, o óleo de andiroba e seu componente liminóide foram efetivos contra *Plasmodium falciparum*, alcançando cerca de 80% de inibição em concentrações de 8,2L e 3,1 µg/mL respectivamente.

O óleo de *C. guianensis* pode ser utilizado como antialérgico e anti-inflamatório, pois, atua inibindo vários tipos celulares, incluindo mastócitos, eosinófilos, linfócitos T e também age na inibição de vias de sinalização como histamina, bradicinina e fator ativador de plaquetas, diminuindo consequentemente, a formação de edema (Henriques & Penido, 2014).

1.2.4. O gênero *Himatanthus*

Himatanthus spp. pertencem à família *Apocynaceae* e possui diversos nomes populares no Brasil, tais como janaguba ou janauba. Sua distribuição ocorre do Sudeste brasileiro e nos países Guiana, Guiana Francesa e Suriname. O látex é extraído da casca sendo utilizado como anti-inflamatório, antitumoral e antihelmíntico devido à presença do triterpeno lupeol (Lucetti *et al.*, 2010; Vale *et al.*, 2015; Soares *et al.*, 2016).

O extrato obtido da casca de *Himatanthus articulatus* possui os componentes mostrado na figura 4. Estudos realizados por Vale *et al.* (2015) mostraram que esse extrato possui atividade antimalárico e apresentou baixa citotoxicidade em linhagem de células hepáticas cancerígenas HepG2 A16.

1.3. Nanotecnologia e o desenvolvimento de novos fármacos

A nanociência aborda a manipulação de átomos e moléculas em escala manométrica, a saber, um nanômetro equivale à bilionésima parte do metro, 1×10^{-9} . Por definição uma nanopartícula mede de 5 nm até 100 nm aproximadamente, porém para a aplicação desta tecnologia na área de farmácia, uma molécula carreadora pode ter tamanho superior a 100 nm para carregar uma quantidade de fármaco ideal, mas isso não causa prejuízo em sua funcionalidade (De Jong & Borm, 2008).

O uso da nanotecnologia tem crescido sem precedentes; no Brasil, sua aplicação na medicina tem sido desenvolvida desde a década de 1990. Mundialmente, o mercado de nanoestruturas para liberação controlada de fármacos movimentam 60 bilhões de dólares/ano e são consumidos por 100 milhões de pessoas anualmente. A estimativa é que em um futuro próximo esses medicamentos correspondam a 40% da venda de produtos farmacêuticos (Venugopal *et al.*, 2009). O objetivo da nanociência aplicada às áreas médicas e farmacêuticas é obter fármacos mais seguros, biodegradáveis, que

permaneçam biodisponíveis por tempo maior, biocompatíveis com as membranas biológicas e melhorar o desempenho de fármacos com formulações hidrofóbicas (Saha *et al.*, 2010).

1.4. Encapsulação em micela

A encapsulação em polímeros biodegradáveis possui muitas vantagens que a nanotecnologia permite alcançar, dentre elas estão a baixa citotoxicidade para órgãos não-alvo, diminuição das interações medicamentosas e liberação controlada do fármaco (Venugopal *et al.*, 2009). Nanofármacos mais potentes estão sendo desenvolvidos com capacidade multifuncionais, capazes de agregar mais de uma função às nanoestruturas e responder a estímulos, como alteração de pH, temperatura, fluorescência, sendo promissores para tratar pacientes com doenças tais como fúngicas, virais e cânceres (Torchilin, 2014).

As formulações das nanopartículas podem ser feitas de moléculas orgânicas e/ou inorgânicas, que são responsáveis por carregar, agregar ou conduzir fármacos bioativos ou sondas pelo corpo, possuindo um alvo específico (Figura 5). Ainda, é possível que o próprio fármaco seja feito em nanopartícula (Duncan, 2003; Kipp, 2004). As formulações são feitas conforme o objetivo e alvo de cada fármaco e devem ser consideradas as barreiras fisiológicas que serão encontradas e o estágio da doença (Moghimi *et al.*, 2001).

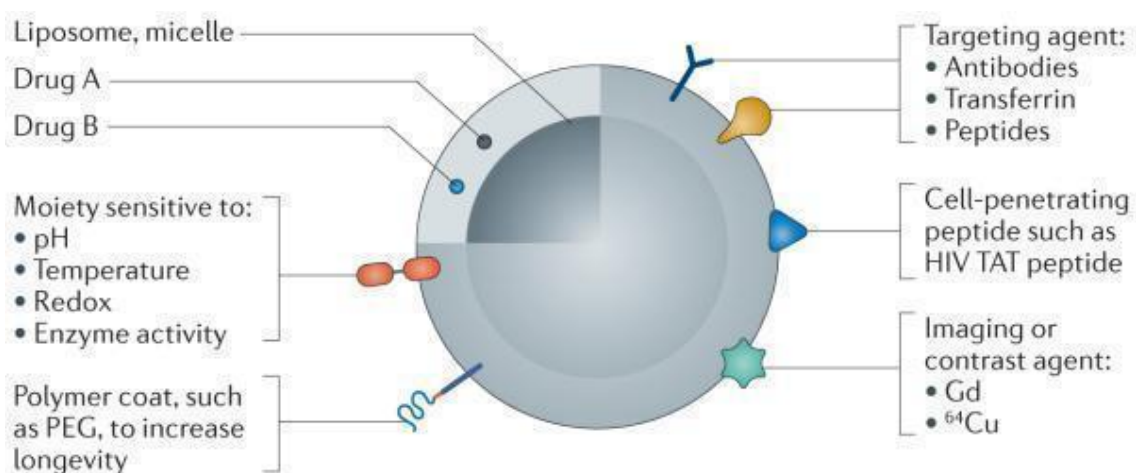


Figura 5. Sistema de liberação de um nanofármaco multifuncional: esse sistema pode ser feito com lipossoma ou micela polimérica e suporta mais de um fármaco, podendo direcioná-los a um órgão ou alvo específico dependendo da finalidade e são sensíveis a estímulos (Torchilin, 2014).

No tratamento *in vitro* contra Leishmaniose, foi testado o sistema de entrega de fármacos; utilizando compostos naturais e sintéticos, ambos encapsulados, os compostos revelaram ser um bom candidato a fármaco combatendo *Leishmania donovani* em comundongos infectados (Basu & Lala, 2004). O avanço desta tecnologia na área da oncologia permite novas estratégias de tratamento de células cancerígenas resistentes a fármacos. Por exemplo, o melfalano, utilizado para tratar carcinomas, foi encapsulado em nanopartícula. Assim, a nanopartícula proporcionou estabilidade e potencializou o efeito do fármaco significativamente, induzindo a morte de células de carcinoma resistente (Michel *et al.*, 2016).

Apesar das nanopartículas serem promissoras, há uma grande preocupação com a toxicidade destas moléculas, pois estudos de populações que são expostas às nanopartículas sólidas resultante de combustão, mostraram que estas causaram problemas cardiovasculares e doenças respiratórios (Borm & Müller-Schulte, 2006). Sendo assim, neste trabalho foi escolhida a micela Pluronic[®] F-127, pois é um veículo de proteínas e peptídeos terapêutico, caracterizado como biomaterial, o qual é aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) e apresenta segurança em sua utilização (Stratton *et al.*, 1997; Akash *et al.*, 2014).

Pluronic[®] F-127 é um copolímero termos sensível produzido de forma sintética, utilizado para aumentar a estabilidade e solubilidade de um fármaco com caráter hidrofóbico. Uma micela de Pluronic[®] F-127 é formada de blocos de copolímeros poli (óxido de etileno) (POE) e blocos hidrofóbicos de poli (óxido de propileno) (POP) formando um monômero de estrutura POE-POP-POE.

Os blocos POE-POP-POE unidos apresentam caráter anfifílico e são utilizados para encapsular fármacos hidrofóbicos. A encapsulação ocorre de forma que, com o aumento da temperatura e na presença de um solvente aquoso, os monômeros se deslocam para a formação das micelas esféricas (Figura 6). As partes hidrofóbicas tendem a se unir formando interações favoráveis, reduzindo a energia livre do sistema e a estrutura hidrofílica fica disposta na interface que contém o solvente aquoso, atingindo assim um equilíbrio químico (Cui *et al.*, 2008; Akash *et al.*, 2017).

A micela Pluronic[®] F-127 mantém a termostase dos fármacos incorporados que são completamente recuperados após a dissolução da micela termossensíveis em temperatura corporal em caso de excesso de tampão e/ou fluido biológico (Stratton *et al.*, 1997; Akash *et al.*, 2014). De acordo com a literatura, Pluronic[®] F-127 tem sido amplamente estudado para a entrega sustentada de um grande número de fármacos ativos.

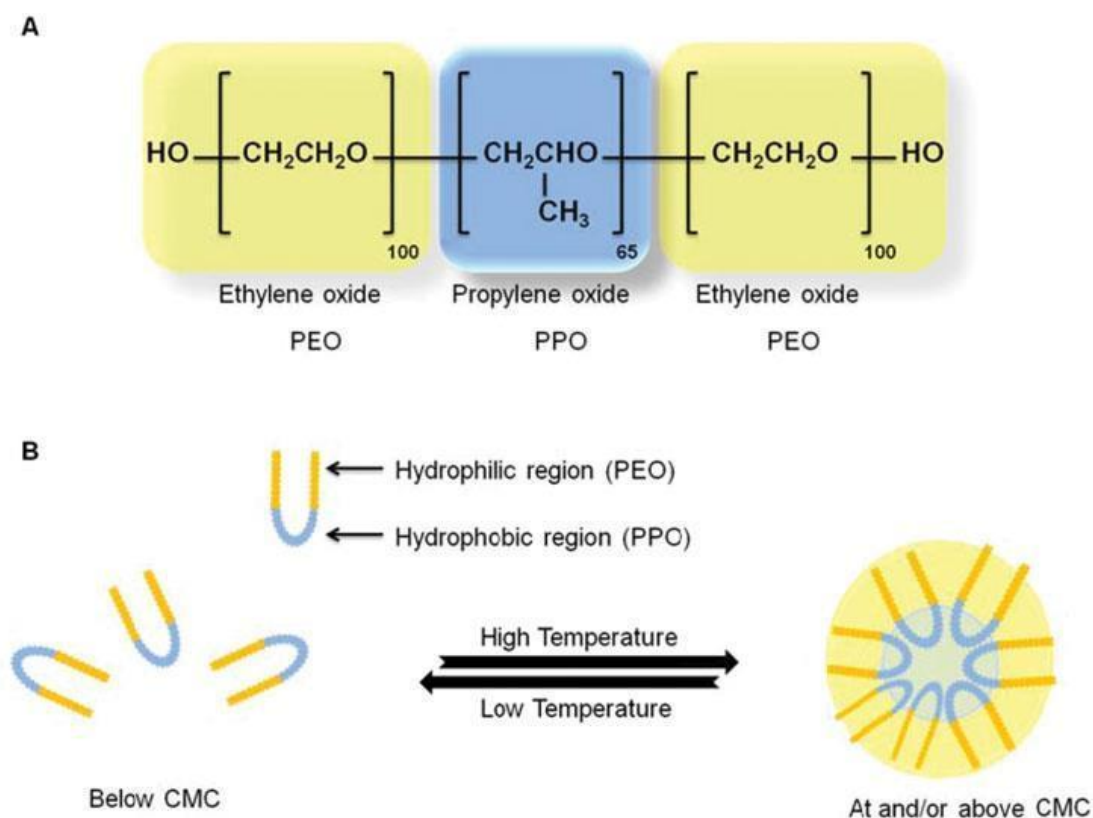


Figura 6. Formação do copolímero de Pluronic[®] F-127. A) Fórmula estrutural do copolímero em bloco Pluronic[®] F-127 e (B) representação esquemática da formação de micelas. CMC; Concentração crítica de micelas, PPO; Poli (Óxido de propileno), PEO; Poli (óxido de etileno) (Akash *et al.*, 2017).

2. Justificativa

Uma estimativa mundial aponta que 1,2 bilhões de pessoas sofrem de alguma infecção causada por fungos patogênicos (Denning & Browley, 2015). *Paracoccidioides* representa o gênero de fungos termodimórficos causadores da PCM que se restringem à América Latina, cujo principal país endêmico é o Brasil. A infecção fúngica acomete principalmente trabalhadores rurais do sexo masculino em estágio de maior produtividade ou nas últimas décadas de vida causando infecções graves que podem ocasionar a morte. Apesar da disponibilidade de antifúngicos no mercado, a busca por novos antifúngicos se faz necessária, visto a resistência que os fungos têm adquirido visando proteger-se dos agentes estressores. O tratamento clínico contra a PCM é agressivo podendo prolongar-se por meses ou até anos e frequentemente ocasiona a desistência do paciente (Schueffler & Anke, 2014; Mendes *et al.*, 1994). Neste sentido, a busca por compostos promissores tem sido investigada por muitos pesquisadores, com o objetivo de desenvolver fármacos mais eficazes, seguros e com menos efeitos colaterais.

Os óleos naturais obtidos de plantas nativas brasileiras são utilizados pela população como alternativa para tratar doenças graves e moderadas. O óleo de copaíba, por exemplo possui inúmeras propriedades antimicrobianas contra *Aspergillus spp.*, *Candida spp.* (Deus *et al.*, 2009), *Staphylococcus spp.* (Santos *et al.* 2008), inibindo esses organismos de forma eficiente. Assim, neste trabalho buscou-se investigar a atividade desse e de outros óleos naturais no fungo *Paracoccidioides spp.* visando sua utilização como fitoterápico.

3. Objetivo Geral

Analisar a resposta de quatro isolados de *Paracoccidioides* spp. frente aos óleos andiroba, copaíba e sucupira, óleo copaíba imobilizado em micela Pluronic[®] F-127 (óleo- micela), látex de janaúba e ao composto β -cariofileno.

3.1. Objetivo Específicos

-  Avaliar a atividade antifúngica dos óleos naturais andiroba, copaíba, látex de janaúba e sucupira, óleo- micela e -cariofileno β em *Paracoccidioides* spp.;
-  Avaliar a citotoxicidade dos óleos naturais andiroba, copaíba, látex de janaúba, sucupira, óleo- micela e -cariofileno β em células Balb/c 3T3;
-  Avaliar células sanguíneas expostas aos óleos naturais copaíba e sucupira, bem como o óleo de copaíba imobilizado em micela;
-  Determinar o tipo de interação entre os óleos naturais copaíba e sucupira, bem como do óleo de copaíba imobilizado em micela, e os antifúngicos itraconazol, anfotericina B, bactrim e sulfametoxazol.

CAPÍTULO II

Manuscrito: Antifungal activity of the oil extracted from *Copaifera langsdorffii*, *Copaifera langsdorffii* oil in Pluronic[®] F-127 micelle and β -Caryophyllene on *Paracoccidioides* spp.

Antifungal activity of the oil extracted from *Copaifera langsdorffii*, *Copaifera langsdorffii* oil in Pluronic[®] F-127 micelle and β -Caryophyllene on *Paracoccidioides* spp.

Meire Ane Costa Miguel¹, Livia do Carmo Silva¹, Emília Lima², Lucília Kato², Cecília Maria Alves de Oliveira², Célia Maria de Almeida Soares¹, Maristela Pereira¹

¹Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil; ²Laboratório de Produtos Naturais, Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

[#]Corresponding author: Maristela Pereira, Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Biologia Molecular, Avenida Esperança s/n, Campus Samambaia, Goiânia, GO, Brazil, 74690-900, Phone/fax: +55 62 35211110. Email address: maristelaufg@gmail.com

BACKGROUND: Paracoccidioidomycosis (PCM) is mycosis systemic caused by thermodynamophilic fungus *Paracoccidioides* spp. that is found in endemic regions of Latin America, with the largest number of cases being registered in Brazil. PCM therapy is a slow process performed with the administration of toxic antifungals for months or years, necessitating research by new antifungal compounds. The copaiba oil has numerous pharmacological properties and when encapsulated in nanoparticles become even more promising. β -caryophyllene is a major component of copaiba oil and its inhibitory activity against various microorganisms has also been reported.

OBJECTIVES: This study evaluated the antifungal activity of copaiba oil and copaiba oil immobilized in Pluronic[®] F-127 micelle (oil-micelle) in *Paracoccidioides* spp., cytotoxicity in Balb/3T3 cells and the interaction with amphotericin B, sulfamethoxazole-trimethoprim (SXT), and itraconazole.

METHODS: Minimum inhibitory concentration (MIC) and cytotoxicity of the compounds were determined by the microdilution technique. Minimum fungicidal concentration (CFM) was determined by plaque growth, and checkerboard technique was used to determine the interaction of the natural compounds with antifungal agents.

FINDINGS: The copaiba oil and oil-micelle exhibited fungicide activity with MIC values of 62.5 µg/mL and 125 µg/mL, respectively. The β-caryophyllene did not inhibit the growth of *Paracoccidioides* spp.. The copaiba oil and oil-micelle had no significant hemolytic activity and cytotoxicity in Balb/c 3T3 cells at MIC concentrations. The antifungal amphotericin B was synergistic with copaiba oil and oil-micelle, presenting fractional inhibitory concentration (FIC) of 0.75.

MAIN CONCLUSIONS: Copaiba oil and oil-micelle showed to be promising to assist in the treatment of PCM, since they inhibit the fungus growth and present neither cytotoxic nor hemolytic effects. In addition, copaiba oil and oil-micelle in combination with the antifungal amphotericin B demonstrated additive activity.

Keywords: *Paracoccidioides* spp., natural compounds, oils, micelle, antifungal.

INTRODUCTION

The use of plants with therapeutic potential has contributed in the treatment of several diseases and open discussions about their pharmacological effects (Kumar *et al.*, 2015). Brazil is the country that holds the greatest biodiversity of flora on the planet, represented in the biomes Amazonia, Cerrado, Mata Atlântica, Caatinga, Pampa and Pantanal (Overbeck *et al.*, 2007). Several species of plants from Brazilian regions produce natural oils with high chemical diversity and pharmacological potentials, making them promising in the application as medicinal herbs (Dutra *et al.*, 2016).

Copaibas are trees native in the tropical region of Latin America, extending from Mexico of the Argentine. Of the 72 existing species of the *Copaifera* genus, 17 are endemic in Brazil, distributed in the Southeast, Midwest and Amazon regions. Among the most abundant species present in Brazil highlights *Copaifera officinalis* L., *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera reticulata* Ducke, *Copaifera multijuga* Hayne, *Copaifera confertiflora* Bth., *Copaifera langsdorffii* Desf., *Copaifera coriacea* Mart., *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke (Veiga Junior & Pinto, 2002). These trees are producers of secondary metabolites, which are stored naturally in their trunk in order to protect themselves against herbivorous animals and predators. Chemically, the copaiba oil is formed by resinous acids and volatile compounds, with predominance of diterpenes and sesquiterpenes, such as α-humulene, α and β-selinene, β-bisabolene and β-caryophyllene (Neto *et al.*, 2008). Several therapeutic applications have been

associated with copaiba oil, as antimicrobial, analgesic, antifungal and antitumor activity (Santos *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2008).

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a mycosis restricted in Latin America caused by dimorphic fungi of the genus *Paracoccidioides* that are grouped within two species: *Paracoccidioides brasiliensis*, formed by a complex of four phylogenetic groups, as S1, recently subdivided into the lines S1a and S1b, PS2, PS3, PS4, and *Paracoccidioides lutzii* (Muñoz *et al.*, 2016; Turissini *et al.*, 2017). PCM, is responsible for high rates of premature deaths and socioeconomic repercussions, especially in specific social segments, such as rural workers living in endemic areas, between 30 and 50 years of age and male (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). In comparison with the other endemic PCM countries, Brazil is responsible for the majority of PCM cases, with 2.4 million of cases annually (Sifuentes-Osornio *et al.*, 2012; Martinez, 2015). Due to its incapacitating nature, PCM is a public health problem.

The therapeutic limitations of antifungal currently available for PCM, has been an incentive for research by new compound, and development of drugs more effective and with fewer side effects (Zambuzzi *et al.*, 2013; Prado *et al.*, 2014; Do Carmo *et al.*, 2015). In addition, the use of nanotechnology has improved the performance of hydrophobic compound, including antifungals, increasing stability and solubility of the molecule, decreasing cytotoxicity and drug interactions (De Jong & Borm, 2008; Amaral *et al.*, 2009).

This work investigated the biological activity of oil copaiba and copaiba oil immobilized in Pluronic[®] F-127 micelle (oil-micelle), in the inhibition of the growth of *Paracoccidioides* spp, cytotoxic potential in Balb/c 3T3 cells and hemolytic activity. In addition, the interaction of copaiba oil and oil-micelle with the antifungal amphotericin B, sulfamethoxazole-trimethoprim (SXT), and itraconazole, used in the treatment of PCM was investigated.

METHODOLOGY

Oil and antifungal agents

The natural copaiba oil was extracted from the species *C. langsdorffii*, collected in Brazilian territory. The β -caryophyllene (80% de purity; Sigma-Aldrich, Missouri,

USA), antifungal amphotericin B (Sigma-Aldrich), SXT (Prati Donaduzzi, Paraná, BRA) and itraconazole (Tokarski Com. & Ind. Ltd., Paraná, BRA) were purchased.

Synthesis and characterization of copaiba oil in Pluronic[®] F-127 micelle

The oil-micelle were prepared by the solid dispersion method, in partnership with the Institute of Chemistry of the Federal University of Goiás. The micelle were homogenized with copaiba oil and both dissolved in alcohol and placed in the rotary evaporator. Subsequently the sample was hydrated with deionized water and left under mechanical stirrer IKA RW20.N at 60 °C. After this procedure, the samples were filtered using a 0.22 µm filter. The sample was placed in the freeze drier until the entire dried sample was obtained. After this procedure was stored at -20 °C and when rehydrated was maintained at 4 °C for use. The encapsulation efficiency was determined from the HPLC lyophilized encapsulated copaiba samples. The stability of the oil-micelle was qualitatively analyzed at room temperature from the observation of the sample. Stable, the sample is homogeneous and transparent, and when it is not stable, it has precipitated compounds. Infrared spectroscopy analysis spectra of the oil-micelle and micelle were obtained in order to certify the presence of copaiba oil within micelle.

Microorganism and culture conditions

Paracoccidioides lutzii (Pb01) and *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb03, Pb18 and Pb83 isolates) were incubated in liquid Fava-Netto medium as described by Fava-Netto & Raphael (1961) (0.3% protease peptone, 1% peptone, 0.5% (w/v) meat extract, 0.5% (w/v) yeast extract, 1% brain heart infusion, 4% glucose, 0.5% NaCl), pH 7.2 for 48 h at 37 °C under shaking. Posteriorly, the cells were centrifuged at 5,000 *g*, washed with phosphate buffered saline (0.09% Na₂HPO₄, 0.02% KH₂PO₄, 0.8% NaCl, 0.02% KCl), pH 7.2, transferred to chemically defined medium Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI 1640, Sigma-Aldrich) and maintained under incubation for 16 h, at 37 °C under shaking for the adaptation of fungal cells.

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC)

The determination of MIC for the four isolates (*Pb01*, *Pb03*, *Pb18* and *Pb83*) was performed using the microdilution technique, as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2008) and adapted according with De Paula *et al.* (2013). The natural oils were dissolved in 0.1% dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich). In each well of the microplate, different concentrations of the copaiba oil, and oil-micelle were added together with fungal suspension in the final concentration of 1×10^5 cells/mL. To determine the maximum fungal growth (positive control), the cells were placed in the presence of only RPMI medium and to obtain maximum inhibition value (negative control) cultures aliquots received the antifungal itraconazole. Plates were maintained at 37 °C, under agitation for 48 h. After this period, 20 µL of the resazurin solution (a redox indicator) was added at 0.02% and incubated subsequently for 24 h. The MIC was determined visually, from reduction of resazurin (blue) to resorufin (pink). The visual analysis was confirmed by reading the absorbance as described by Rampersad (2011).

Determination of minimum fungicide concentration (MFC)

The MFC was determined for the four isolates of *Paracoccidioides* spp. Cells were incubated with copaiba oil, and oil-micelle, serially diluted, maintaining the same concentrations and culture conditions used in the MIC test. A subculture was performed by transferring of 20 µL of the material corresponding to MIC, MICx2 and MICx4 to plate containing solid Fava-Netto. As control of fungal growth, an aliquot of the positive control was also plated. The plates were incubated at 37 °C for 7 days, with subsequent visual readout. The MFC was defined as the lowest concentration where fungal growth is not visualized.

Cytotoxicity concentration (CC)

The Balb/c 3T3 clone A31 (ATCC® CCL-163™) cells were c

Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM, Sigma-Aldrich), supplemented with 10% fetal bovine serum (Nutricell, São Paulo, BRA). The total of 1×10^5 cells/mL was incubated with different concentrations of the copaiba oil or oil-micelle for 48 h, at 37 °C, 5% CO₂. Posteriorly, 20 µL of the 0.02% resazurin solution was added to each microwell, incubating for 24 h under the same conditions of the assay. The CC was

determined visually and confirmed by reading the absorbance as described by Rampersad (2011).

Hemolysis assay

Human blood was collected in tubes containing heparin and washed three times with phosphate buffered saline, pH 7.4 (PBS). 2% erythrocyte solution was prepared (v/v) and distributed in microtube. Posteriorly, were added different concentrations of copaiba oil, and oil-micelle. The positive hemolysis control was obtained using 1% triton-X100, and to negative control of hemolysis was used PBS. The microtubes were incubated for 30 min at room temperature. After, the samples were centrifuged at 5,000 *g* for 10 min. The supernatant was transferred to microplate and absorbance was quantified by spectrophotometry at 540 nm. Two independent experiments were performed, and the samples were done in quintuplicate. The % hemolysis was calculated following the formula: $\frac{\text{absorbance of the sample} - \text{negative control}}{\text{absorbance positive control} - \text{negative control}} \times 100$.

Interaction between copaiba oil and oil-micelle and antifungals

The combined effect of the synthetic antifungals (itraconazole, amphotericin B, and SXT) with copaiba oil and oil-micelle was determined using the checkerboard technique. Initially, 50 μL of each antifungal in combination with 50 μL of the copaiba oil or oil-micelle, were disposed orderly: in the horizontal direction, there was a decreasing in the copaiba oil or oil-micelle concentrations and in the vertical, a decreasing in the concentrations of the synthetic antifungal. 100 μL fungal suspension of *Paracoccidioides* spp. were added at final concentration of 1×10^5 cells/mL. After 48 h of incubation at 37 °C, under agitation, 20 μL of resazurin solution (0.02%) was added and again incubated for 24 h. The wells that retain blue staining were considered absent from fungal growth, and wells that showed pink staining indicated fungal growth. The type of interaction was determined by applying the fractional inhibitory concentration (FIC), calculated using the formula: $\text{FICs} = \text{FIC}_A + \text{FIC}_B$, where FIC_A is the MIC of compound A combined divided by the MIC of compound A alone; FIC_B is MIC of compound B combined divided by MIC of compound B alone. The FICIs were

interpreted as follows: synergic, $FIC \leq 0.1$ to ≤ 4 , antagonistic $FIC > 4$, as proposed

RESULTS

The *in vitro* antifungal activity of copaiba oil, oil-micelle and-caryophyllene β was evaluated at different concentrations against *Paracoccidioides* spp. after 72 h of treatment. The MIC, MFC, CC and selectivity index (SI) are showed in table I. Copaiba oil inhibited the growth of all *Paracoccidioides* spp. isolates, showing similar MIC (62,5 μ g/mL) and MFC (62.5 μ g/mL). The oil-micelle, also showed similar MIC (125 μ g/mL) and MFC (125 μ g/mL) for all isolated. Until the concentration of 2,000 μ g/mL, β -caryophyllene did not inhibit the growth of *Paracoccidioides* spp. and MFC was not found. The cytotoxicity of copaiba oil, oil-micelle and-caryophyllene β was evaluated in Balb/c 3T3 cells, resulting in the CC of 250 μ g/mL, 500 μ g/mL and 2,000 μ g/mL, respectively. To calculate SI, the CC was divided by MIC. Copaiba oil and oil-micelle presented similar-caryophylleneSIitwas(SI=4);notfound. to β

The hemolytic activities of copaiba oil and oil-micelle were dose-dependent to the concentrations tested. The quantity of 62.5 μ g/mL corresponding to MIC of copaiba oil caused 0.14% of hemolytic activity, while the quantity of 125 μ g/mL corresponding to MIC of oil-micelle caused 0.25% (Table II).

The combination between copaiba oil and amphotericin B resulted in additive interaction, decreasing the MIC of amphotericin from 0.75 μ g/mL to 0.18 μ g/mL and of copaiba oil from 62.5 μ g/mL to 31.25 μ g/mL for all isolates (Table III). The combination between copaiba oil/SXT and copaiba oil/itraconazole resulted in an indifferent interaction, so none potentiated the effect of the other. Similar effect was found for copaiba oil-micelle that also presented an additive interaction only with amphotericin B, decreasing the MIC of amphotericin B from 0.75 μ g/mL to 0.18 μ g/mL and of the oil-micelle from 125 μ g/mL to 62.5 μ g/mL for all isolates. Indifferent interaction was found for the combinations of oil-micelle with SXT and itraconazole, so none potentiated the effect of the other.

DISCUSSION

Several problems related to the current antifungal have been evidenced, mainly with respect to the toxicity and resistant isolates (Hahn *et al.*, 2003; Shikanai-Yasuda 2015). The research for compounds, especially those derived from the plant species, gain importance due to their availability and popular usage, which often ensures safety with regard to their toxicity (Gupta *et al.*, 2015).

The therapeutic effects of *Copaifera* spp. have been constantly reported, such as anti-inflammatory (Veiga Junior *et al.*, 2007), antineoplastic (Gomes *et al.*, 2008), antimicrobial (Abrão *et al.*, 2015), and antifungal (Zimmermam-Franco *et al.*, 2013). The oils from *Copaifera martii*, *C. reticulata* and *C. officinalis* had activity in *Trichophyton rubrum* with MIC ranging from 250 µg/mL to 500 µg/mL. The *C. multijuga* oil showed fungistatic activity against *Aspergillus flavus* and *Candida parapsilosis* with MIC of 80 µg/mL and 100 µg/mL, respectively (Deus *et al.*, 2011). *C. langsdorffii* showed fungicidal activity against *Trichophyton mentagrophyte* (MIC and MFC = 170 µg/mL), and caused structural alterations on fungus membrane suggesting cell death due to changes in membrane permeability, similarly to antifungal agents of the class of polyenes (Zimmermam-Franco *et al.*, 2013).

Despite of several reports of antifungal activity of copaiba oil, its activity in *Paracoccidioides* spp. is not yet known. In addition, no interaction study of this oil with commercial antifungal was performed. Thus, the investigation of its bioactive potential, safety profile and interaction with other antifungal agents was performed here. We focused our research on species *C. langsdorffii*. The data showed (table I) that copaiba oil had good antifungal activity (MIC and MFC= 62.5 µg/mL) compared with other natural compound tested in *Paracoccidioides* spp., as oenotein B, compound isolated from the Cerrado plant *Eugenia uniflora*, that presented MIC of 500 µg/mL against *P. lutzii* (Zambuzzi-Carvalho *et al.*, 2013), and extracts from Atacama Desert fungi that presented MIC of 125 to 500 µg/mL. It is important to note that copaiba oil showed a fungicidal effect on *Paracoccidioides* spp. cells. Of the drugs available for the treatment of PCM, only amphotericin b has a fungicidal effect, but its use is limited, due to its low selectivity that culminates in potentially fatal side effects (Samuel *et al.*, 2011).

Copaiba oil is composed of resinous acids and volatile compounds, being β-caryophyllene, the major component of copaiba oil (Neto *et al.*, 2008). The large diversity of studies involving β-caryophyllene demonstrates their high potential as antimicrobial, insecticidal and anti-plasmodial (Kotan *et al.*, 2008; Dahham *et al.*, 2015). So, β-caryophyllene also was tested against *Paracoccidioides* spp., but no

inhibitory activity was found against this fungus, suggesting that in this microorganism, it is not responsible for that inhibitory action or that the combination of all components of the oil could provide its antifungal effect.

With the advent of nanotechnology, the encapsulation of natural oils has been known to potentiate its effects against resistant organisms that affect the population. Svetlichny *et al.* (2015) demonstrated that the oil of *C. multijuga* in micelle potentiated the action against the pathogenic fungi *Candida krusei*, *C. parapsilosis* and *T. rubrum*. In addition, Alencar *et al.* (2015) demonstrated the antimicrobial action of copaiba oil of *C. langsdorffii* in micelle against azole resistant *Staphylococcus* and *Candida* spp.

Pluronic[®] F-127 are hydrophilic copolymer blocks (polyethylene oxide) and hydrophobic copolymer blocks (polypropylene oxide) forming an amphiphilic triblock copolymer, which has significant potential for drug delivery, as it is able self-assemble into nanosize micelle in aqueous solutions, increasing the stability and solubility of a hydrophobic drug (Khattak *et al.*, 2005). In view of these characteristics, we hypothesized that the immobilization of oil-micelle could improve the solubility of copaiba oil and potentiate their bioactive effects. Oil-micelle showed better solubility, however did not potentiated the effect of copaiba oil against *Paracoccidioides* spp..

In the drug development flow, rejection of a compound in the final stages leads to a major financial loss. In addition, it is necessary to propose molecules that do not imply potential hazards in the use. Thus, regarding drug safety, it is important to perform a strict quality control in the early stages of this process. The results show that the selectivity index of copaiba oils and oil-micelle were considered satisfactory (SI=4). In addition, the copaiba oil and oil-micelle, at the concentration of 62,5 µg/mL e 125 µg/mL, respectively, do not cause hemolysis (Table II). Following the parameters presented by Amin & Dannenfelser (2006), values < 10% may not be hemolytic, while values > 25% to be at risk. The hemolytic effect can induce anemia in patients, due osmotic lysis caused by increased permeability of the plasma membrane (Aparicio *et al.*, 2005), oxidation of hemoglobin (Bukowska & Kowalska, 2004), and loss of lipids in the erythrocyte plasma membrane (Brito *et al.*, 2002). The hemolysis test and cytotoxicity demonstrate the safety of using the copaiba oils and oil-micelle, but it is important to emphasize that they can not be used in a discriminated way by the population. In addition, the β-caryophyllene cytotoxic concentration in Balb/c 3T3 cells did not has inhibitory activity at the concentrations tested in *Paracoccidioides* spp.,

therefore, it was not possible to calculate the cytotoxic concentration and the selectivity index.

One of the major benefits of combination of antifungal agents is obtainment synergy, reducing the amount of antifungal used in treatment, reducing so toxicity. However, other antagonistic effects, reduction of the efficacy of both antifungals can be evidenced in a combination antimicrobial therapy (Cuenca-Estrella, 2004). In this scenario, the use of techniques to evaluate the combinatorial potential among bioactive compounds, as checkerboard has been employed (Svetaz *et al.*, 2016). The term checkerboard refers to the standard of how the test compounds are distributed on a microdilution plate, presenting a great advantage since it is possible to test combinations of different concentrations in a single test. Thus, this technique was used to elucidate the type of interaction that copaiba oil would have with the commercial antifungal agents used in the treatment of PCM.

The copaiba oil and oil-micelle showed an additive effect with the antifungal amphotericin B, reducing the MIC of amphotericin B of 0.75 $\mu\text{g/mL}$ to 0.18 $\mu\text{g/mL}$ (Table III). In addition, MIC to copaiba oil and oil-micelle also decreased. This finding makes copaiba oil and oil-micelle even more promising as antifungal, since reducing the concentration of amphotericin B would lead to fewer toxic effects. The other antifungal did not have the action combined with the copaiba oil and oil-micelle; they were indifferent. Synergic and additive effects have been observed between natural oils and antifungals. El-Ahmady *et al.* (2013) evaluated the synergistic effect of natural oils and their results indicated significant synergistic effects between thyme oil and amphotericin B against *C. albicans* and *Aspergillus niger*. Cinnamon oil also acted synergistically with amphotericin B against *C. albicans*.

CONCLUSION

Copaiba oil and oil-micelle inhibited *Paracoccidioides* spp. growth efficiently. No cytotoxicity or hemolytic effect was observed at MIC concentration. When combined with amphotericin B, copaiba oil, oil-micelle and amphotericin B had a reduction of their MIC, suggesting that copaiba oil and oil-micelle may be an efficient antifungal to be employed together amphotericin B in the treatment of PCM.

REFERENCES

- Abrão F, de Araújo Costa LD, Alves JM, Senedese JM, de Castro PT, Ambrósio SR, Veneziani RCS, Bastos JK, Tavares DC, Martins CHG. *Copaifera langsdorffii* oleoresin and its isolated compounds: antibacterial effect and antiproliferative activity in cancer cell lines. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2015; 15: 443.
- Alencar EN, Xavier-Júnior FH, Morais ARV, Dantas TRF, Dantas-Santos N, Verissimo LM, Rehder VLG, Chaves GM, Oliveira AG, Egitol EST. Chemical Characterization and Antimicrobial Activity Evaluation of Natural Oil Nanostructured Emulsions. *J. Nanosci. Nanotechnol*. 2015; 15: 880–888.
- Amaral AC, Bocca AL, Ribeiro AM, Nunes J, Peixoto DL, Simioni AR, Primo FL, Lacava ZG, Bentes R, Titze-de-Almeida R, Tedesco AC, Morais PC, Felipe MS. Amphotericin B in poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and dimercaptosuccinic acid (DMSA) nanoparticles against paracoccidioidomycosis. *J Antimicrob Chemother*. 2009; 63(3): 526-33.
- Amin K1, Dannenfelser RM. In vitro hemolysis: guidance for the pharmaceutical. *J Pharm Sci*. 2006; 95(6): 1173-6.
- Aparicio RM, Garcia-Celma MJ, Vinardell MP, Mitjans M. In vitro studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2005; 39: 1063–1067.
- Basso LA, Silva LHP da, Fett-Neto AG, Junior A, De WF, Moreira Í de S, Palma MS, Calixto JB, Astolfi Filho S, Santos RR dos, Soares MBP, Santos DS. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2005; 100: 475–506.
- Brito MA, Silva RFM, Brites D. Bilirubin induces loss of membrane lipids and exposure of phosphatidylserine in human erythrocytes. *Cell Biology and Toxicology*. 2002; 18: 181-192.
- Bukowska B, Kowalska S. Phenol and catechol induce pre-hemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. *Toxicology Letters*. 2004; 152: 73–84.
- Cuenca-Estrella M. Combinations of antifungal agents in therapy--what value are they?. *J Antimicrob Chemother*. 2004; 54(5): 854-69.

- Dahham SS, Tabana YM, Iqbal MA, Ahamed MB, Ezzat MO, Majid AS, Majid AM. The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene β -Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules*. 2015; 20(7): 11808-29.
- De Jong WH, Borm PJ. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *Int. J. Nanomedicine*. 2008; 3: 133–149.
- De Paula e Silva AC, Oliveira HC, Silva JF, Sangalli-Leite F, Scorzoni L, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJ. Microplate alamar Blue assay for *Paracoccidioides* susceptibility testing. *J Clin Microbiol*. 2013; 51(4): 1250-2. Deus RJA, Alves CN, Arruda MSP. Evaluation of the antifungal effect of oleoresin and essential oil of copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne). *Rev. Bras. Plantas Med*. 2011; 13: 01–07.
- Do Carmo SL, Tamayo Ossa DP, Castro SV, Bringel Pires L, Alves de Oliveira CM, Conceição da Silva C, Coelho NP, Bailão AM, Parente-Rocha JA, Soares CM, Ruiz OH, Ochoa JG, Pereira M. Transcriptome Profile of the Response of *Paracoccidioides* spp. to a Camphene Thiosemicarbazide Derivative. *PLoS One*. 2015; 10(6): 0130703.
- Dutra RC, Campos MM, Santos AR, Calixto JB. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacol Res*. 2016; 112: 4-29.
- El-Ahmady S, El-Shazly M, Milad R. The Synergetic Efficacy of the Combination of Amphotericin B and Certain Essential Oils against Selected Fungal Clinical Isolates. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2013; 3: 026–030.
- Fava-Netto C, Raphael A. A reação intradérmica com polissacáride de *Paracoccidioides brasiliensis* na blastomicose sul-americana. *Rev. Inst. Med. trop S. Paulo*. 1961; 3: 161-5.
- Gomes N de M, Rezende C de M, Fontes SP, Hovell AMC, Landgraf RG, Matheus ME, Pinto A da C, Fernandes PD. Antineoplastic activity of *Copaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich tumor. *J. Ethnopharmacol*. 2008; 119: 179–184.
- Gupta PK, Jaiswal AK, Asthana S, Teja B V, Shukla P, Shukla M, Sagar N, Dube A, Rath SK, Mishra PR. Synergistic enhancement of parasitocidal activity of amphotericin B using copaiba oil in nanoemulsified carrier for oral delivery: an

- approach for non-toxic chemotherapy. *Br. J. Pharmacol.* 2015; 172: 3596–3610.
- Hahn RC, Morato Conceição YT, Santos NL, Ferreira JF, Hamdan JS. Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and in vitro resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole. *Mycoses.* 2003; 46(8): 342-347.
- Khattak SF, Bhatia SR, Roberts SC. Pluronic F127 as a cell encapsulation material: utilization of membrane-stabilizing agents. *Tissue Eng.* 2005; 11(5-6): 974–983.
- Kotan R, Kordali S, Cakir A, Kesdek M, Kaya Y, Kilic H. Antimicrobial and insecticidal activities of essential oil isolated from Turkish *Salvia hydrangea* DC. ex Benth. *Biochem. Syst. Ecol.* 2008; 36: 360-368.
- Kumar S, Paul S, Walia YK, Kumar A, Singhal P. Therapeutic Potential of Medicinal Plants: A Review. *J. Biol. Chem. Chron.* 2015; 1(1): 46-54
- Martinez R. Epidemiology of Paracoccidioidomycosis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 2015; 57: 11–20.
- Muñoz JF, Farrer RA, Desjardins CA, Gallo JE, Sykes S, Sakthikumar S, Misas E, Whiston EA, Bagagli E, Soares CM, Teixeira MM, Taylor JW, Clay OK, McEwen JG, Cuomo CA. Genome Diversity, Recombination and virulence across the Major Lineages of *Paracoccidioides*. *Ecological and Evolutionary Science.* 2016; 1(5): 213-16.
- Neto JSL, Gramosa NV, Silveira ER. Constituintes químicos dos frutos de *Copaifera langsdorffii* Desf. *Quim. Nova.* 2008; 31: 1078–1080.
- Overbeck GE, Müller SC, Fidelis A, Pfadenhauer J, Pillar VD, Blanco CC, Boldrini II, Both R, Forneck ED. Brazil's neglected biome: the South Brazilian Campos. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics.* 2007; 9:101-116.
- Prado RS, Alves RJ, Oliveira CM, Kato L, Silva RA, Quintino GO, do Desterro Cunha S, de Almeida Soares CM, Pereira M. Inhibition of *Paracoccidioides lutzii* Pb01 isocitrate lyase by the natural compound argenilactone and its semi-synthetic derivatives. *PLoS One.* 2014; 9(4): 94832.
- Rampersad SN. A Rapid Colorimetric Microtiter Bioassay to Evaluate Fungicide Sensitivity Among *Verticillium dahliae* Isolates. *APS Journal.* 2011; 95:248-255.

- Samuel H, Alex C.McL, Christine P, Ryan McL. Amphotericin B Is Cytotoxic at Locally Delivered Concentrations. *Clinical Orthopedical Relat.* 2011; 469(11): 3016-3021.
- Santos AO dos, Ueda-Nakamura T, Filho D, Prado B, Junior V, F V, Pinto AC, Nakamura CV. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2008; 103: 277–281.
- Shikanai-Yasuda MA, Filho T, Queiroz F de, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. Guideliness in paracoccidioidomycosis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2006; 39: 297–310.
- Shikanai-Yasuda MA. Paracoccidioidomycosis treatment. *Revista Instituto Medicinal Tropical.* 2015; 19:31-37.
- Sifuentes-Osornio J, Corzo-León DE, Ponce-de-León LA. Epidemiology of Invasive Fungal Infections in Latin America. *Curr. Fungal Infect.* 2012; 6: 23–34.
- Svetaz LA, Postigo A, Butassi E, Zacchino SA, Sortino MA. Antifungal drugs combinations: a patent review 2000-2015. *Expert Opin Ther Pat.* 2016; 26(4):439-53.
- Svetlichny G, Kulkamp-Guerreiro IC, Cunha SL, Silva FEK, Bueno K, Pohlmann AR, Fuentefria AM, Guterres SS. Solid lipid nanoparticles containing copaiba oil and allantoin: development and role of nanoencapsulation on the antifungal activity. *Pharm.* 2015; 70: 155–164.
- Turissini DA, Gomez OM, Teixeira MM, McEwen JG, Matute DR. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. *Fungal Genet Biol.* 2017; 5(17): 30093-2.
- Zambuzzi-Carvalho PF, Tomazett PK, Santos SC, Ferri PH, Borges CL, Martins WS, Almeida Soares CM de, Pereira M. Transcriptional profile of *Paracoccidioides* induced by oenothien B, a potential antifungal agent from the Brazilian Cerrado plant *Eugenia uniflora*. *BMC Microbiol.* 2013; 13: 227.
- Zimmermam-Franco DC, Bolutari EB, Polonini HC, Carmo AMR do, Graças A. M. Chaves M das, Raposo NRB 2013. Antifungal Activity of *Copaifera langsdorffii* Desf Oleoresin against Dermatophytes. *Molecules* 18: 12561–12570.
- Veiga Junior VF, Rosas EC, Carvalho MV, Henriques MG, Pinto AC. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera*

cearensis Huber ex Ducke, *Copaifera reticulate* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne - A comparative study. *J. Ethnopharmacol.* 2007; 112 (2): 248-254.

Veiga Junior VF, Pinto AC. O GÊNERO *Copaifera* L. *Quím. Nova.* 2002; 25:2.

Table I. Biological activity of copaiba oil, oil-micelle and β -caryophyllene

Samples	Isolate	MIC $\mu\text{g/mL}$	MFC	CC $\mu\text{g/mL}$	SI
Copaiba oil	<i>Pb01</i>	62.5	62.5	250	4
	<i>Pb03</i>	62.5	62.5		4
	<i>Pb18</i>	62.5	62.5		4
	<i>Pb83</i>	62.5	62.5		4
Oil-micelle	<i>Pb01</i>	125	125	500	4
	<i>Pb03</i>	125	125		4
	<i>Pb18</i>	125	125		4
	<i>Pb83</i>	125	125		4
β -caryophyllene	<i>Pb01</i>	>2,000	not found	2,000	not found
	<i>Pb03</i>	>2,000	not found	2,000	not found
	<i>Pb18</i>	>2,000	not found	2,000	not found
	<i>Pb83</i>	>2,000	not found	2,000	not found

Minimum inhibitory concentration of fungal growth; minimum fungicide concentration (MFC); cytotoxic concentration (CC) of Balb/c 3T3 cells growth; selectivity index (SI).

Table II. Percentage of hemolytic activity of copaiba oil and Oil-micelle

Hemolytic activity (%)						
Oil	2000	1000	500	250	125	62,5
	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$
Copaiba	2.41	1.64	0.52	0.38	0.17	0.14
Oil-micelle	0.67	0.48	0.45	0.44	0.25	0.12

Results obtained from the mean of independent experimental triplicates.

Table III. *In vitro* interaction of copaiba and oil-micelle with amphotericin B, sulfamethoxazole+trimethoprim (SXT) and itraconazole in *Paracoccidioides* spp.

Copaiba oil + Amphotericin B				
	<i>Pb01</i>	<i>Pb03</i>	<i>Pb18</i>	<i>Pb83</i>
MIC _A Copaiba	62.5	62.5	62.5	62.5
MIC _B Amphotericin B	0.75	0.75	0.75	0.75
MIC _A Combined	31.25	31.25	31.25	31.25
MIC _B Combined	0.18	0.18	0.18	0.18
FIC _A	0.50	0.5	0.5	0.5
FIC _B	0.24	0.24	0.24	0.24
FIC	0.74	0.74	0.74	0.74
Interaction	Additive	Additive	Additive	Additive
Copaiba oil + SXT				
	<i>Pb01</i>	<i>Pb03</i>	<i>Pb18</i>	<i>Pb83</i>
MIC _A Copaiba	62.5	62.5	62.5	62.5
MIC _B SXT	2.32	2.32	2.32	2.32
MIC _A Combined	31.25	31.25	31.25	31.25
MIC _B Combined	1.16	1.16	1.16	1.16
FIC _A	0.5	0.5	0.5	0.5
FIC _B	0.5	0.5	0.5	0.5

FIC	1	1	1	1
Interaction	Indifferent	Indifferent	Indifferent	Indifferent
Copaiba oil + Itraconazole				
	Pb01	Pb03	Pb18	Pb83
MIC _A Copaiba	62.5	62.5	62.5	62.5
MIC _B Itraconazole	0.001	0.003	0.003	0.003
MIC _A Combined	31.25	31.25	31.25	31.25
MIC _B Combined	0.0005	0.001	0.001	0.001
FIC _A	1	1	1	1
FIC _B	0.5	0.5	0.5	0.5
FIC	1.5	1.5	1.5	1.5
Interaction	Indifferent	Indifferent	Indifferent	Indifferent
Oil-micelle + Amphotericin B				
	Pb01	Pb 03	Pb18	Pb83
MIC _A Oil-micelle	125	125	125	125
MIC _B Anfotericin B	0.75	0.75	0.75	0.75
MIC _A Combined	62.5	62.5	62.5	62.5
MIC _B Combined	0.18	0.18	0.18	0.18
FIC _A	0.5	0.5	0.5	0.5
FIC _B	0.24	0.24	0.24	0.24
FIC	0.74	0.74	0.74	0.74
Interaction	Additive	Additive	Additive	Additive
Oil-micelle +SXT				
	Pb01	Pb03	Pb18	Pb83
MIC _A Oil-micelle	125	125	125	125
MIC _B SXT	2.32	2.32	2.32	2.32
MIC _A Combined	125	125	125	125
MIC _B Combined	0.07	0.07	0.07	0.07
FIC _A	1	1	1	1
FIC _B	0.03	0.03	0.03	0.03
FIC	1.03	1.03	1.03	1.03
Interaction	Indifferent	Indifferent	Indifferent	Indifferent
Oil-micelle + Itraconazole				
	Pb01	Pb03	Pb18	Pb83
MIC _A Oil-micelle	125	125	125	125
MIC _B Itraconazole	0.001	0.003	0.003	0.003
MIC _A Combined	125	125	125	125
MIC _B Combined	0.005	0.001	0.001	0.001
FIC _A	1	1	1	1
FIC _B	0.5	0.5	0.5	0.5
FIC	1.05	1.05	1.05	1.05
Interaction	Indifferent	Indifferent	Indifferent	Indifferent

The inhibitory concentrations are shown in µg/mL. Fractional inhibitory concentration (FIC); MIC of compound A (MIC_A); MIC of compound B (MIC_B); MIC of compound A combined divided by the MIC of compound A alone (FIC_A); MIC of compound B combined divided by MIC of compound B alone (FIC_B).

CAPÍTULO III

Atividade antifúngica de óleos extraídos de *Pterodon* spp., *Carapa* spp. e látex de *Himatanthus* spp. em *Paracoccidioides* spp.

Neste projeto, também foi avaliada a atividade antifúngica dos óleos extraídos de *Pterodon* spp. (sucupira), *Carapa* spp. (andiroba) e o látex de *Himatanthus* spp. (janaúba) em *Paracoccidioides* spp.. Em adição, foram realizados testes de segurança para verificar a citotoxicidade dos mesmos e o *checkerboard* do óleo sucupira com os antifúngicos utilizados no tratamento da Paracoccidioidomicose (PCM).

1. Materiais e métodos

1.1 Óleos e agentes antifúngicos

Os óleos de andiroba e sucupira e o látex de janaúba foram extraídos de *Carapa* spp., *Pterodon* spp. e *Himatanthus* spp. respectivamente, coletadas em território brasileiro. Os agentes antifúngicos, anfotericina B (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), sulfametoxazol-trimetoprima (SXT, Prati Donaduzzi, Paraná, BRA) e itraconazol (Tokarski Com. & Ind. Ltda, Paraná, BRA) foram comprados.

1.2 Micro-organismo e condições de cultivo

P. Lutzii (Pb01) e *P. brasiliensis* (Pb03, Pb18 e Pb83) foram incubados em meio Fava-Netto líquido como descrito por Fava-Netto & Raphael (1961) (0.3% protease peptona, 1% peptona, 0.5% (w/v) extrato de carne, 0.5% (w/v) extrato de levedura, 1% *Brain Heart Infusion*, 4% glicose, 0.5% NaCl), pH 7.2 por 48 horas a 37 °C sob agitação no shaker a 5.000 *g*. As células foram lavadas três vezes com tampão fosfato salino (0,09% Na₂HPO₄, 0,02% KH₂PO₄, 0,8% NaCl, 0,02% KCl), pH 7.2 e centrifugadas a 5.000 *g*. Em seguida, as células do fungo foram transferidas ao meio quimicamente definido *Roswell Park Memorial Institute medium* (RPMI 1640, Sigma-Aldrich) e mantido sob incubação por 16 horas, a 37 °C, para adaptação das células fúngicas .

1.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação de CIM para os quatro isolados (Pb01, Pb03, Pb18 e Pb83) foi realizada através da técnica de microdiluição, como preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008) e adaptado conforme de Paula *et al*.

(2013). Os óleos naturais foram dissolvidos em 0,1% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich). Em cada poço da microplaca, as diluições em série dos óleos de andiroba e sucupira e o látex de janaúba, foram adicionados em conjunto com a suspensão fúngica na concentração final de 1×10^5 células/mL. Para determinar o crescimento máximo de fungos (controle positivo) as células foram colocadas na presença apenas de meio RPMI. Para obtenção do valor máximo de inibição (controle negativo) foi adicionado o antifúngico itraconazol às células fúngicas. As placas foram mantidas à 37°C, sob agitação a 5.000 g, por 48 h. Após este período, foi adicionado 20 µL da solução resazurina (um indicador redox) a 0,02% e incubado posteriormente por 24 h.

A CIM foi determinada visualmente observando-se a redução de resazurina (azul) até resorufina (rosa). A análise visual foi confirmada pela leitura da absorbância utilizando a leitora de microplaca (SpectraMax[®] Paradigm[®] Multi-Mode), utilizando a fórmula descrita por Rampersad (2011), $AB = [(O2 \times A1) - (O1 \times A2)] / [(R1 \times N2) - (R2 \times N1)] \times 100$ onde, $AB = [(34,798 \times \text{absorbância teste 540nm}) - (47,619 \times \text{absorbância teste 630 nm})] / [(104,395 \times \text{absorbância controle sem células a 630 nm}) - (5,494 \times \text{absorbância controle sem células 540 nm})] \times 100$ Coeficiente oxidado 540 nm: 47,619; Coeficiente reduzido 540 nm: 104,395; Coeficiente reduzido 630 nm = 5,494; Coeficiente oxidado 630 nm = 34,798.

1.4 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A CFM foi determinada para os quatro isolados de *Paracoccidioides* spp.. As células foram incubadas com os óleos de andiroba e sucupira e o látex de janaúba, diluídos em série e mantendo as mesmas concentrações e condições de cultivo utilizadas no teste de CIM. Uma subcultura foi realizada por transferência de 20 µL do material correspondente ao CIM, CIM2x, CIM4x para uma placa contendo Fava-Netto sólido. Como controle do crescimento fúngico, foi também plaqueada uma alíquota do controle positivo. As placas foram incubadas em estufa à 37 °C por 7 dias, com subsequente observação visual. A CFM foi definida como a menor concentração na qual o crescimento fúngico não foi visualizado.

1.5 Concentração citotóxica (CC)

As células BALB/c 3T3 clone A31 (ATCC[®] CCL-163[™]) foram cultivadas por três dias em meio *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM; Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Nutricell, São Paulo, BRA) e gentamicina (50 µg/mL), na estufa úmida com 5% de CO₂ à 37 °C. Um total de 1x10⁵ células/mL foi incubada com diferentes concentrações dos óleos andiroba e sucupira e látex de janaúba, diluídos de forma seriada, variando de 2000 µg/mL a 32 µg/mL, durante 48 h, 5% de CO₂ à 37 °C. Posteriormente, foram adicionados 20 µL de resazurina a 0,02% em cada micropoço e incubado por 24 h nas mesmas condições do ensaio. A CC foi determinada visualmente e confirmada pela leitura da absorbância como descrito por Rampersad (2011).

1.6 Teste de hemólise

O sangue humano foi coletado em tubos contendo heparina e lavado três vezes com tampão com fosfato salino, pH 7,4. Uma solução de eritrócitos de 2% foi preparada (v/v) e distribuído em microtubos. Posteriormente, foram adicionados diferentes concentrações de óleo de copaíba e sucupira e o látex de janaúba. O controle positivo de hemólise foi obtido usando 1% de triton-X100. Para o controle negativo de hemólise foi utilizado PBS. Os microtubos foram incubados durante 30 min à temperatura ambiente. Depois, as amostras foram centrifugadas a 5.000 g durante 10 min. O sobrenadante foi transferido para a microplaca e a absorbância foi quantificada por espectrofotometria a 540 nm. Foram realizados dois experimentos independentes, e as amostras foram feitas em quintuplicado. A % de hemólise foi calculada a partir da fórmula: $\text{absorbância da amostra} - \text{controle negativo} / \text{controle absorvente positivo} - \text{controle negativo} \times 100$.

1.7 Interação entre o óleo essencial e o antifúngico

O efeito combinado dos antifúngicos sintéticos (itraconazol, anfotericina B e SXT) com o óleo de sucupira foi realizado utilizando a técnica de diluição *checkerboard* (Johnson *et al.*, 2004). Inicialmente, 50 µL de cada antifúngico em combinação com 50 µL do óleo de sucupira foi disposto de maneira ordenada: no sentido horizontal houve um decréscimo das concentrações dos antifúngicos sintéticos e na vertical um decréscimo das concentrações da sucupira. 100 µL de suspensão fúngica de *Paracoccidioides* spp. foram adicionados na concentração de 1x10⁵ células/mL.

Após 48 h de incubação à 37 °C, sob agitação a 5.000 g, adicionou-se 20 µL da solução de resazurina (0,02%) e novamente incubou-se por 24 h. Os poços que mantiveram a coloração azul foram considerados ausentes do crescimento fúngico, e os poços que apresentaram a coloração rosa indicaram o crescimento fúngico.

O tipo de interação foi determinado pela aplicação da Concentração inibitória fracionada (CIF) calculada através da fórmula: $CIFs = CIFA + CIFB$, onde CIFA é a CIM do composto A combinada dividida pelo CIM do composto A sozinho; FICB é CIM do composto B combinada dividida pela CIM do composto B sozinho. Os CIFs foram interpretados como a seguir: sinérgico $CIF > 1$ a ≤ 4 , antagônico $CIF >$

2. Resultado

A atividade antifúngica *in vitro* dos óleos de andiroba, sucupira e o látex de janaúba foram avaliados em diferentes concentrações contra *Paracoccidioides* spp. após 72 h de tratamento. Observou-se que o óleo de sucupira causou inibição em todos os isolados, apresentando CIM e CFM de 250 µg/mL. O óleo de andiroba e o látex de janaúba foram testados nos quatro isolados. Entretanto, não inibiram o crescimento fúngico nas concentrações de 32 µg/mL a 2000 µg/mL.

Em células Balb/c 3T3, a CC do óleo de sucupira foi de 375 µg/mL. Para calcular o IS, a CIM foi dividida pela CC. O óleo de sucupira apresentou IS = 1,5 e para o óleo de andiroba e o látex de janaúba os valores de IS não foram encontrados. A taxa hemolítica para o óleo de sucupira foi de 0,22 % na concentração de CIM 250 µg/mL.

A interação do óleo de sucupira (250 µg/mL) com anfotericina B, SXT e itraconazol foi avaliada utilizando o ensaio *checkerboard*. Não foi observado sinergismo para nenhuma das combinações, no entanto, não houve antagonismo (Tabela III).

3. Discussão

As aplicações fitoterápicas dos óleos de andiroba e sucupira e do látex de janaúba são inúmeras. Entretanto, sua atividade biológica em *Paracoccidioides* spp. ainda não havia sido investigada.

Aqui, o óleo de sucupira teve sua atividade biológica confirmada contra quatro isolados de *Paracoccidioides* spp.. Outros estudos, relataram que o óleo de *Pterodon pubescens* testado em formulações de sabão, conferiu proteção contra o helminto *Schistosoma mansoni*. Este efeito protetor já foi descoberto na década de 1980, sugerindo o uso tópico de sabão contendo em sua formulação o óleo de sucupira ou suas frações isoladas (Santos Filho *et al.*, 1987).

A atividade do óleo comercial de *P. pubescens* e seus componentes isolados foram investigados na busca de agentes terapêuticos para a doença de Chagas o óleo mostrou ser três vezes mais ativo do que suas frações contra *Trypanosoma cruzi* (Menna-Barreto *et al.*, 2008). Roque (2015), utilizando esta mesma espécie, fracionou o óleo por cromatografia e realizou testes *in vitro* contra os isolados de *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. Os resultados mostraram que o composto isolado geranilgeraniol, inibiu o crescimento fúngico e causou alterações morfológicas comprovadas por microscopia eletrônica de transmissão. Um composto hexânico isolado da espécie *P. polygalaeiflorus*, também demonstrou atividade contra o vetor *A. aegypti* com concentração larvicida (CL₅₀) de 23,99 µg/mLetal., (Pim 2006). Assim, o óleo de sucupira, além de outras propriedades farmacológicas, também pode ser utilizado como anti-fúngico em *Paracoccidioides* spp..

A família Meliaceae foi testada em dois clones de *P. falciparum*, mostraram 100% de inibição em uma cepa resistente à cloroquina, um fármaco usado no tratamento contra a malária, nas concentrações de 8,2 µg/mL e 3,1 µg/mL, respectivamente (Miranda Júnior *et al.*, 2012). O óleo extraído de *C. guianensis* tem efeitos antialérgico e anti-inflamatório, pois atua inibindo vários tipos celulares, incluindo mastócitos, eosinófilos, linfócitos T e também atua na inibição de vias de sinalização como histamina, bradicinina e fator ativador de plaquetas, diminuindo consequentemente, a formação de edema (Henriques & Penido, 2014). O óleo de andiroba não teve ação sobre os quatro isolados de *Paracoccidioides* spp. estudados neste trabalho, sugerindo que este fungo não é suscetível a esses componentes.

Himatanthus spp. possui compostos diclorometanos extraídos da casca e do caule, os quais possuem atividade *in vitro* contra *P. falciparum*, uma estirpe resistente à cloroquina (Vale *et al.*, 2015). Em outro estudo, o extrato bruto e as frações de

Himatanthus lancifolius inibiram a ação acetilcolinesterase (AChE), uma atividade realizada por fármacos usados no tratamento da doença de Alzheimer. O extrato de *H. lancifolius* (5.000 µg/mL) inibiu fração50%de acetatoda atividadeetilo

obtida do óleo inibiu de forma mais eficiente a atividade de AChE, seguido da fração de diclorometano. 0,45 μ M de uleína, um *H. alcal lancifolius*, inibiu 50% da atividade de AChE (Seidl *et al.*, 2010). O óleo de

Himatanthus spp., apesar de ter várias aplicações, não inibiu o crescimento dos isolados de *Paracoccidoides* spp..

CAPÍTULO IV

Considerações Finais

Paracoccidioides spp. representa fungos termodimórficos causadores da micose sistêmica denominada PCM. Esta é uma doença negligenciada, de caráter altamente incapacitante, acomete principalmente trabalhadores rurais do sexo masculino que vivem nas regiões endêmicas da América Latina e no Brasil corresponde a 80% dos casos de incidência. Novos registros em regiões brasileiras que ainda não eram conhecidas como endêmicas tem sido relatadas, situação que pode estar diretamente relacionada ao desmatamento de áreas que foram utilizadas na pecuária, agricultura e expansão urbana.

A PCM tem se tornado um problema para a saúde pública, pois em idade de alta produtividade, os trabalhadores precisam se ausentar por um longo período de tempo para realizar o tratamento doença. No tratamento da PCM os antifúngicos utilizados são preferencialmente derivados dos azóis, polienos ou equinocandinas, que são administrados em altas concentrações por via oral ou cutânea por meses ou até anos. Estes fármacos produzem efeitos colaterais indesejados, tais como dor de cabeça, náuseas, diarreia, anemias, comprometimento das funções renais, necrose epidérmica, distúrbios metabólicos, dentre outros. Além disso, a retirada antecipada tem sido relacionado com altas taxas de recaídas do paciente (Hahn *et al.*, 2003; Shikanai-Yasuda, 2015).

As limitações dos antifúngicos dá abertura a discussão da utilização de plantas como potenciais terapêuticos. Elas são grandes produtoras de metabólitos secundários que são utilizadas para sua sobrevivência, e seus produtos podem ser isolados e utilizados para produzir formulações terapêuticas brutas ou purificadas. Os óleos naturais com princípio ativo promissor abrem a possibilidade de se obter formulações melhoradas, seguras e economicamente acessíveis.

Os óleos naturais de *C. langsdorffii*, *Carapa* spp., *Pterodon* spp., látex de *Himatanthus* spp.-cariofileno, β são conhecidos por suas propriedades fitoterápicas contra diversos patógenos, porém ainda não haviam descritas em *Paracoccidioides* spp.. Desta forma, neste o óleo natural de *C. langsdorffii* foi testado e revelou ser fungistático mostrando CIM (62,5 $\mu\text{g/mL}$) e CFM 5 $\mu\text{g/similaresL}$). O óleo-micela, não potencializou o efeito do óleo copaíba, apresentando CIM (125 $\mu\text{g/mL}$) e CFM (125 $\mu\text{g/mL}$) similares para todos os isolados, apesar de ter aumentado a solubilidade em água. O β -cariofileno, componente majoritário do óleo copaíba, não inibiu o crescimento de *Paracoccidioides* spp. até a concentração de 2000 $\mu\text{g/mL}$ e CFM não foi encontrado, sugerindo que este componente não é ativo nestes isolados ou a combinação

de todos os componentes que garante seu efeito inibitório. A citotoxicidade do óleo copaíba e óleo-micela foram avaliadas em células Balb/c 3T3, resultando no IS similares (IS=4) e para β -cariofileno, o IS não foi encontrado. O teste hemolítico demonstrou que o óleo copaíba e óleo-micela tiveram atividade dose-dependente nas concentrações testadas e são seguros nas concentrações de inibição dos quatro isolados de *Paracoccidioides* spp. porém, não devem ser utilizados de forma indiscriminada.

Em busca da sinergia, os fármacos utilizados no tratamento da PCM foram usados em combinação com o óleo copaíba a fim de diminuir a concentração de inibição no fungo e consequentemente seus efeitos colaterais. O antifúngico anfotericina B resultou na interação aditiva com o óleo copaíba, com decréscimo do CIM de 0,75 $\mu\text{g/mL}$ para 0,18 $\mu\text{g/mL}$ e o óleo copaíba de 62,5 $\mu\text{g/mL}$ para 31,25 $\mu\text{g/mL}$ em todos os isolados. O óleo-micela teve ação aditiva apenas com anfotericina B, semelhante ao óleo copaíba, o CIM da anfotericina B sofreu redução de 0.75 $\mu\text{g/mL}$ para 0.18 $\mu\text{g/mL}$ e o óleo-micela de 125 $\mu\text{g/mL}$ para 62.5 $\mu\text{g/mL}$ para todos os isolados. Assim, o óleo copaíba combinado com anfotericina B pode ser utilizado para auxiliar no tratamento da doença.

O óleo andiroba e o látex de janaúba não tiveram ação sobre os quatro isolados de *Paracoccidioides* spp. até a concentração 2000 $\mu\text{g/mL}$ e sua citotoxicidade em células Balb/c 3T3 não foi encontrada. O óleo sucupira causou inibição em todos os isolados, apresentando CIM e CFM de 250 $\mu\text{g/mL}$ e em célula óleo de sucupira foi de e 375baixaatividade $\mu\text{g/mL}$ hemolíticaapresent.

Os antifúngicos não tiveram efeito sinérgico com o óleo sucupira, no entanto atividade antagônica não foi demonstrada.

4. Conclusões

-  Os óleos de copaíba e sucupira inibiram o crescimento de *Paracoccidioides* spp., enquanto que os óleos de andiroba, o látex de -janaúbacariofilenonãotiveram o β atividade neste gênero de fungo até as concentrações testadas.
-  Não foi observada citotoxicidade ou efeito hemolítico significativos na concentração do MIC referente aos óleos de copaíba, sucupira e óleo-micela.
-  O óleo de sucupira não teve ação aditiva com os antifúngicos utilizados no tratamento da PCM.
-  O óleo de copaíba e o óleo-micela tiveram ação aditiva quando combinados com a anfotericina B, reduziram o MIC desse antifúngico, sugerindo que o óleo de copaíba pode ser um bom candidato a auxiliar no tratamento da PCM.

5. Perspectivas

-  Isolar e identificar os componentes do óleo de copaíba e testar contra *Paracoccidioides* spp..
-  Produzir o óleo de sucupira imobilizado em micela Pluronic[®] F-127.
-  Encapsular anfotericina e óleo copaíba em micela e testar *in vitro* contra *Paracoccidioides* spp..
-  Testar óleo copaíba *in vivo* em camundongos infectados com *Paracoccidioides* spp..

6. Referências

- Abrão F, Costa LDA, Alves JM, Senedese JM, de Castro PT, Ambrósio SR, Veneziani RCS, Bastos JK, Tavares DC, Martins CHG. *Copaifera langsdorffii* oleoresin and its isolated compounds: antibacterial effect and antiproliferative activity in cancer cell lines. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2015; 15: 443.
- Adler-Moore J, Proffitt RT. AmBisome: liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience. *J Antimicrob Chemother*. 2002; 49 (1): 21-30.
- Akash MSH, Rehman K, Sun H, Chen S. Assessment of release kinetics, stability and polymer interaction of PF127-based thermosensitive gel of interleukin-1 receptor antagonist. *Pharm. Dev. Technol*. 2014; 19: 278–284.
- Akash MSH, Rehman K, Sun H, Chen S. Pluronic F127-Based Thermosensitive Gels for Delivery of Therapeutic Proteins and Peptides. *Polymer Reviews*. 2014; 54(4): 573-597.
- Alencar EN, Xavier-Júnior FH, Morais ARV, Dantas TRF, Dantas-Santos N, Verissimo LM, Rehder VLG, Chaves GM, Oliveira AG, Egitol EST. Chemical Characterization and Antimicrobial Activity Evaluation of Natural Oil Nanostructured Emulsions. *J. Nanosci. Nanotechnol*. 2015; 15: 880–888.
- Alexandre AS, Rocha WC. Perfil cromatográfico por TLC do óleo e dos extratos das folhas e caule de andiroba, *Carapa guianensis* Aubl. *Scientia Amazonia*. 2017; 6(2): 117-125.
- Almeida LFR de, Portella R de O, Bufalo J, Marques MOM, Facanali R, Frei F. Non-Oxygenated Sesquiterpenes in the Essential Oil of *Copaifera langsdorffii* Desf. Increase during the Day in the Dry Season. *Plos One*. 2016; 11: 0149332.
- Almeida SP, Proença CEB, Sano SM, Ribeiro JF. Cerrado: Espécies Vegetais Úteis. *EMBRAPA-CPAC*. 1998; 464.
- Amin K1, Dannenfelser RM. In vitro hemolysis: guidance for the pharmaceutical. *J Pharm Sci*. 2006; 95(6): 1173-6.
- Amiel, E., Ofir, R., Dudai, N., Soloway, E., Rabinsky, T. and Rachmilevitch, S. (2012) β -Caryophyllene, a Compound Isolated from the Biblical Balm of Gilead (*Commiphora gileadensis*), Is a Selective Apoptosis Inducer for Tumor Cell

Lines. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2012; 872394

- Aparicio RM, Garcia-Celma MJ, Vinardell MP, Mitjans M. *In vitro* studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2005; 39: 1063–1067.
- Aristizábal BH, Clemons KV, Cock AM, Restrepo A, Stevens DA. Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice: influence of the hormonal status of the host on tissue responses. *Med Mycol*. 2002; 40(2):169-78.
- Aristizabal BH, Clemons KV, Stevens DA, Restrepo A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. *Infect Immun*. 1998; 66(11): 5587-91.
- Arriaga AMC, Castro MAB, Silveira ER, Braz- Filho R. Further diterpenoids isolated from *Pterodon polygalaeflorus*. *J Braz Chem Soc*. 2000; 11: 187-190.
- Bagagli E, Theodoro RC, Bosco SM, McEwen JG. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. *Mycopathologia*. 2008; 165: 197-207.
- Barbosa W, Vasconcelos WM. Ação da sulfamatoxazol associada a trimetoprim na terapêutica da blastomicose sul-americana. *Rev Pat Trop*. 1973; 2: 329-339.
- Basso LA, Silva LHP da, Fett-Neto AG, Junior A, De WF, Moreira Í de S, Palma MS, Calixto JB, Astolfi Filho S, Santos RR dos, Soares MBP, Santos DS. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2005; 100: 475-506.
- Basu MK, Lala S. Macrophage specific drug delivery in experimental leishmaniasis. *Curr. Mol. Med*. 2004; 4: 681-689.
- Bastos KP, Bailão AM, Borges CL, Faria FP, Felipe MSS, Silva MG, Martins WS, Fiúza RB, Pereira M, Soares CMA. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. *BMC Microbiol*. 2007; 7: 29.
- Beauvais A1, Latgé JP. Membrane and cell wall targets in *Aspergillus fumigatus*. *Drug Resist Updat*. 2001; 4(1): 38-49.
- Bellissimo-Rodrigues F, Vitali LH, Martinez R. Serological diagnosis of paracoccidioidomycosis in HIV-co-infected patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010; 105: 904-7.

- Bennett RN, Wallsgrove RM. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytol.* 1994; 127: 617-633.
- Bittencourt JIM, Oliveira RM, Coutinho ZF. Paracoccidioidomycosis in the State of Paraná, Brazil, 1980/1998. *Cadernos de Saúde Pública.* 2005; 21(6): 1856-1864.
- Blotta MHSL, Mamoni RL, Oliveira SJ, Nouér SA, Papaioordanou PMO, Goveia A, Camargo ZP. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 548 cases in the southeast region. *Am J Trop Med Hig.* 1999; 61: 390-394.
- Borges CL, Bailão AM, Bão SN, Pereira M, Parente JA, Almeida Soares CM de. Genes potentially relevant in the parasitic phase of the fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia.* 2011; 171: 1–9.
- Borm PJ, Müller-Schulte D. Nanoparticles in drug delivery and environmental exposure: same size, same risks? *Nanomed.* 2006; 1: 235–249.
- Bukowska B, Kowalska S. Phenol and catechol induce pre-hemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. *Toxicology Letters.* 2004; 152: 73–84.
- Calleja MA, Vieites JM, Montero-Meterdez T, Torres MI, Faus MJ, Gil A, Suárez A. The antioxidant-caryophyllene effect protects rat liver from β carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. *Br. J. Nutr.* 2013; 109, 394–401.
- Catalán M, Monteiro JC. Antifúngicos sistémicos. *Rer. Iberoam. Micol.* 2006; 23: 39-49.
- Corredor GG, Peralta LA, Castaño JH, Zuluaga JS, Henao B, Arango M, Tabares AM, Matute DR, McEwen JG, Restrepo A. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. *Med. Mycol.* 2005; 43(3): 275-80.
- Corte AC, Svoboda WK, Navarro IT, et al. Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Paraná State, Brazil. *Mycopathologia.* 2007; 164: 225-228.
- Coutinho ZF, Silva D da, Lazéra M, Petri V, Oliveira RM de, Sabroza PC, Wanke B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad. Saúde Pública.* 2002; 18: 1441-1454.
- Cragg GM, Newman DJ. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1830:3670-3695.

- Cuenca-Estrella M. Combinations of antifungal agents in therapy--what value are they?.
J Antimicrob Chemother. 2004; 54(5): 854-69.
- Cui X, Mao S, Liu M, Yuan H, Du Y. Mechanism of Surfactant Micelle Formation.
Langmuir. 2008; 24: 10771-10775.
- Dahham SS, Tabana YM, Iqbal MA, Ahamed MB, Ezzat MO, Majid AS, Majid AM.
 The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene
 β -Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules.*
 2015; 20(7): 11808-29.
- De Jong WH, Borm PJ. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *Int.*
J. Nanomedicine. 2008; 3: 133-149.
- Demain AL, Fang A. The natural functions of secondary metabolites. *Adv Biochem Eng*
Biotechnol. 2000; 69: 1-39.
- Denning DW, Browley MJ. How to bolster the antifungal pipeline. *Science.* 2015. 347:
 1414.
- De Paula e Silva AC, Oliveira HC, Silva JF, Sangalli-Leite F, Scorzoni L, Fusco-
 Almeida AM, Mendes-Giannini MJ. Microplate alamar Blue assay for
Paracoccidioides susceptibility testing. *J Clin Microbiol.* 2013; 51(4): 1250-2. Deus
 RJA, Alves CN, Arruda MSP. Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo
 essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). *Rev. Bras. Pl. Med.*
 2011; 13(1): 1-7.
- Deus RJA, Carvalho ASC, Banna DADS, Arruda MSP, Alves CN, Santos AS. Efeito
 fungitóxico *in vitro* do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera*
multijuga Hayne). *Rev. Bras. Pl. Med.* 2009; 11(3): 347-353.
- Do Valle AC, Costa RL, Fialho Monteiro PC, Von Helder J, Muniz MM, Zancopé-
 Oliveira RM. Interpretation and clinical correlation of serological tests in
 paracoccidioidomycosis. *Med. Mycol.* 2001; 39: 373–377.
- Duncan R. The dawning era of polymer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003; 2:
 347–360.
- Dutra RC, Pittella F, Dittz D, Marcon R, Pimenta DS, Lopes TP, Raposo NRB.
 Chemical composition and cytotoxicity activity of the essential oil of *Pterodon*
emarginatus. *Rev. bras. farmacogn.* 2012; 22:5.
- El-Ahmady S, El-Shazly M, Milad R. The Synergetic Efficacy of the Combination of
 Amphotericin B and Certain Essential Oils against Selected Fungal Clinical
 Isolates. *Journal of Applied Pharmaceutical Science.* 2013; 3: 026–030.

- Farias MR, Condas LAZ, Ribeiro MG, Bosco SM, Muro MD, Werner J, Theodoro RC, Bagagli E, Marques AS, Franco M. Paracoccidioidomycosis in a dog: Case report of generalized lymphadenomegaly. *Mycopathologia*. 2011; 172: 147-152.
- Fava-Netto C, Raphael A. A reação intradérmica com polissacáride de *Paracoccidioides brasiliensis* na blastomicose sul-americana. *Rev. Inst. Med. trop S. Paulo*. 1961; 3: 161-5.
- Felipe MSS, Andrade RV, Arraes FBM, Nicola AM, Maranhão AQ, Torres FAG, Silva-Pereira I, Poças-Fonseca MJ, Campos EG, Moraes LMP, Andrade PA, Tavares AHFP, Silva SS, Kyaw CM, Souza DP, Pereira M, Jesuino RSA, Andrade EV, Parente JA, Oliveira GS, Barbosa MS, Martins NF, Fachin AL, Cardoso RS, Passos GAS, Almeida NF, Walter MEMT, Soares CMA, Carvalho MJA, Brígido MM, PbGenome Network. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J. Biol. Chem*. 2005; 280: 24706-24714.
- Fernandes CPM, Lima CS, Lopes TV, Félix SR, Schons SV, Fernandes CG, Nobre MO. Utilização do óleo de andiroba (*Carapa guianensis*) em feridas cutâneas de ratos Wistar. *Brazilian Journal of Hygiene and Animal Sanity*. 2014; 8: 3.
- Ferraz IDK, Camargo JLC, Sampaio PTB. Sementes e Plântulas de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa procera* DC.): Aspectos Botânicos, Ecológicos e Tecnológicos. *Manaus: Acta Amazônica*. 2002; 32(4): 647-661.
- Ferreira SP, Santos RS, de Paula LB, Reis AAS. Prevalência da Paracoccidioidomicose em pacientes diagnosticados no Hospital Araújo Jorge em Goiânia-Goiás, Brasil. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*. 2012; 10 (1): 167-177.
- Galceran CB, Sertie JA, Lima CS, Carvalho JC. Anti-inflammatory and analgesic effects of 6 α ,7 β -dihydroxy-vouacapan-17 β -oic acid isolated from *Pterodon emarginatus* Vog. fruits. *Inflammopharmacology*. 2011; 19(3): 139-43.
- Garcia NM, Del Negro GM, Heins-Vaccari EM, de Melo NT, de Assis CM, Lacaz CS. *Paracoccidioides brasiliensis*, a new sample isolated from feces of a penguin (*Pygoscelis adeliae*). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1993; 35: 227-235.
- Gomes N de M, Rezende C de M, Fontes SP, Hovell AMC, Landgraf RG, Matheus ME, Pinto A da C, Fernandes PD. Antineoplastic activity of *Copaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich tumor. *J. Ethnopharmacol*. 2008; 119: 179–184.

- Guarner J, Brandt ME. Histopathologic Diagnosis of Fungal Infections in the 21st Century. *Clin Microbiol Rev.* 2011; 24(2): 247.
- Guèye M, Kenfack D, Forget PM: Importância socio-cultural, potencialidades económicas e terapêuticas do *Carapa* (Meliaceae) au Sénégal. Nas plantas conservadoras do sistema conservador. *Royal Botanic Gardens*; 2009: 357-65.
- Gupta PK, Jaiswal AK, Asthana S, Teja B V, Shukla P, Shukla M, Sagar N, Dube A, Rath SK, Mishra PR. Synergistic enhancement of parasiticidal activity of amphotericin B using copaiba oil in nanoemulsified carrier for oral delivery: an approach for non-toxic chemotherapy. *Br. J. Pharmacol.* 2015; 172: 3596-3610.
- Hahn RC, Morato Conceição YT, Santos NL, Ferreira JF, Hamdan JS. Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and in vitro resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole. *Mycoses.* 2003; 46(8): 342-347.
- Hansen D, Haraguchi M, Alonso A. Pharmaceutical *Pterodon* pro spp.). *Braz. J. Pharm. Sci.* 2010; 46: 607–616.
- Haruki H, Pedersen MG, Gorska KI, Pojer F, Johnsson K. Tetrahydrobiopterin biosynthesis as an off-target of sulfa drugs. *Science.* 2013; 340(6135): 987-91.
- Heath, MC. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology.* 2000; 3(4): 315-319.
- Henriques M das G, Penido C. The therapeutic properties of *Carapa guianensis*. *Curr. Pharm. Des.* 2014; 20: 850–856.
- Hoscheid J, Cardoso MLC. Sucupira as a Potential Plant for Arthritis Treatment and Other Diseases. *Arthritis.* 2015; (2015): 12.
- Keisu M, Wiholm, BE, Palmblad J. Trimethoprim-sulphamethoxazole associated blood dyscrasias. Ten years' experienceusreportingsystem. at th *J Intern Med.* 1990; 228: 353–360.
- Kipp JE. The role of solid nanoparticle technology in the parenteral delivery of poorly water-soluble drugs. *Int. J. Pharm.* 2004; 284: 109–122.
- Kouklakis G, Efremidou EI, Papageorgiou MS, Pavlidou E, Manolas KJ, Liratzopoulos N. Complicated Crohn's-like colitis, associated with Hermansky-Pudlak syndrome, treated with Infliximab: a case report and brief review of the literature. *J Med Case Rep.* 2007; 8 (1): 176.

- Kotan R, Kordali S, Cakir A, Kesdek M, Kaya Y, Kilic H. Antimicrobial and insecticidal activities of essential oil isolated from Turkish *Salvia hydrangea* DC. ex Benth. *Biochem. Syst. Ecol.* 2008; 36: 360-368.
- Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Vaccari EMH, Melo NT. *Tratado de micologia médica*. 9.ed. São Paulo: Sarvier. 2002; 15-829.
- Laniado-Laborín R, Cabrales-Vargas MN. Amphotericin B: side effects and toxicity. *Rev Iberoam Micol.* 2009; 26(4): 223-7.
- Lewis RE. Current Concepts in Antifungal Pharmacology. *Mayo Clin. Proc.* 2011; 86: 805-817.
- Loose DS, Stover EP, Restrepo A, Stevens DA, Feldman D. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1983; 80: 7659-7663.
- Londero AT, Ramos CD. Paracoccidioidomycose. Estudo clínico e micológico de 260 casos observados no interior do Estado do Rio Grande do Sul. *Jornal de Pneumologia*. 1990; 16: 129-132.
- Loth EA, Castro SV, Silva JR, Gandra RF. Occurrence of 102 cases of paracoccidioidomycosis in 18 months in the Itaipu Lake region, western Paraná. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011; 44: 636-7.
- Lucetti DL, Lucetti EC, Bandeira MAM, Veras HN, Silva AH, Leal LKA, Lopes AA, Alves VC, Silva GS, Brito GA, Viana GB. Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. *J. Inflamm. Lond. Engl.* 2010; 7: 60.
- Marques AS, Cortez DB, Lastória JC, Camargo RMP, Marques MEA. Paracoccidioidomycosis: Frequency, Morphology, and Pathogenesis of Tegumentary Lesions. *An. Bras. Dermatol.* 2007; 82: 5.
- Marques, AS. Paracoccidioidomycose: atualização epidemiológica, clínica e terapêutica. *An Bras Dermatol.* 2003; 78: 135-50.
- Martinez R. Epidemiology of Paracoccidioidomycosis. *Rev. Inst. Med. Trop.* 2015; 57: 11-20.
- Martinez R. Paracoccidioidomycosis: the dimension of the problem of a neglected disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2010; 43: 480-480.

- Mendes RP, Negroni R, Arechavala A. Treatment and control of cure. In Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, Boca Ratón. 1994; 373-392.
- Mendes RP, Shikanai-Yasuda MA. Paracoccidioidomycose. In: Cimerman S, Cimerman B. *Medicina Tropical*. 2003; 505-45.
- Mendonça FAC, Silva KFS, Santos KK, Ribeiro Júnior KAL, Sant'Ana AEG. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. *Fitoterapia*. 2005; 76(7–8): 629-636
- Menna-Barreto RFS, Laranja G a. T, Silva MCC, Coelho MGP, Paes MC, Oliveira MM, Castro SL de. Anti-Trypanosoma cruzi activity of Pterodon pubescens seed oil: geranylgeraniol as the major bioactive component. *Parasitol. Res*. 2008; 103: 111-117.
- Michel D, Mohammed-Saeid W, Getson H, Roy C, Poorghorban M, Chitanda JM, Verrall R, Badea I. Evaluation of β -cyclodextrin-modified gemini surfactant-based delivery systems in melanoma models. *Int. J. Nanomedicine*. 2016; 11: 6703–6712.
- Miranda Júnior RNC, Dolabela MF, Silva MN da, Póvoa MM, Maia JGS. Antiplasmodial activity of the andiroba (*Carapa guianensis* Aubl., Meliaceae) oil and its limonoid-rich fraction. *J. Ethnopharmacol*. 2012; 142: 679–683.
- Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol. Rev*. 2001; 53: 283-318.
- Muñoz JF, Farrer RA, Desjardins CA, Gallo JE, Sykes S, Sakthikumar S, Misas E, Whiston EA, Bagagli E, Soares CMA, Teixeira MM, Taylor JW, Clay OK, McEwen JG, Cuomo CA. Genome Diversity, Recombination, and Virulence across the Major Lineages of *Paracoccidioides*. *Ecological and Evolutionary Science*. 2016; 213.
- Neto L, Sousa J, Gramosa NV, Silveira ER. Chemical constituents of the fruits of *Copaifera langsdorffii* Desf. *Quím. Nova*. 2008; 31: 1078–1080.
- Ngo LT, Okogun II, Folk WR. 21st century natural product research and drug development and traditional medicines. *Nat Prod Rep*. 2013; 30(4):584-92.
- Odds FC, Brown AJ, Gow NA. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol*. 2003; 11: 272-279.

- Oliveira AEMFM, Duarte JL, Amado JRR, Cruz RAS, Rocha CF, Souto RNP, Ferreira RMA, Santos K, Conceição EC, Oliveira LAR, Kelecom A, Fernandes CP, Carvalho JCT. Development of a Larvicidal Nanoemulsion with *Pterodon emarginatus* Vogel Oil. *PLoS ONE*. 2016; 11(1): e0145835.
- Oliveira AEMFM, Duarte JL, Cruz RAS, Souto RNP, Ferreira RMA, Peniche T, Conceição ECC, Oliveira LAR, Faustino SMM, Florentino AC, Carvalho JCT, Fernandes CP. *Pterodon emarginatus* oleoresin-based nanoemulsion as a promising tool for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) control. *J Nanobiotechnol*. 2017; 15:2.
- Paniago AM, Aguiar JI, Aguiar ES, da Cunha RV, Pereira GR, Londero AT, Wanke B. Paracoccidioidomycosis: a clinical and epidemiological study of 422 cases observed in Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003; 36: 455-459.
- Pant A, Saikia SK, Shukla V, Asthana J, Akhoun BA, Pandey R. Beta-caryophyllene modulates expression of stress response genes and mediates longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology*. 2014; 57: 81-95
- Parente JA, Borges CL, Bailão AM, Felipe MS, Pereira M, de Almeida Soares CM. Comparison of transcription of multiple genes during mycelia transition to yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis* reveals insights to fungal differentiation and pathogenesis. *Mycopathologia*. 2008; 165(4-5): 259-273.
- Penido C, Costa KA, Costa MF, Pereira Jde F, Siani AC, Henriques Md. Inhibition of allergen-induced eosinophil recruitment by natural tetranortriterpenoids is mediated by the suppression of IL-5, CCL11/eotaxin and NFkappaB activation. *Int Immunopharmacol*. 2006; 6(2):109-21.
- Pimenta ATA, Santiago GMP, Arriaga ÂMC, Menezes GHA, Bezerra SB. Phytotochemical study and evaluation of larvicidal activity of *Pterodon polygalaeflorus* Benth (Leguminosae) against *Aedes aegypti*. *Rev. Bras. Farmacogn*. 2006; 16: 501-505.
- Queiroz-Telles F, McGinnis MR, Salkin I, Graybill JR. Subcutaneous mycoses. *Infect Dis Clin N Am*. 2003; 17:59-85.
- Rampersad SN. A Rapid Colorimetric Microtiter Bioassay to Evaluate Fungicide Sensitivity Among *Verticillium dahliae* Isolates. *APS Journal*. 2011; 95:248-255.
- Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia*. 1985; 23: 323–334.

- Restrepo A, McEwen JG, Castañeda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med. Mycol.* 2001; 39: 233–241.
- Rezende TC, Borges LC, Magalhaes AD. “A qu phases of *Paracoccidioides brasiliensis* using proteomics,” *Journal of Proteomics*. 2011; 75(2): 572-587.
- Ricci G, Mota FT, Wakamatsu A, Serafim RC, Borra RC, Franco M. Canine paracoccidioidomycosis. *Med. Mycol.* 2004; 42: 379-383.
- Roque FP, Aníbal PC, Busato SN, Boni GC, Höfling JF, Queiroz NCA, Foglio MA. In vitro anti-fungal activity of a new compound isolated from *Pterodon pubescens* Benth. *Advancement in Medicinal Plant Research*. 2015; 3(2):55-61.
- Saha RN, Vasanthakumar S, Bende G, Snehalatha M. Nanoparticulate drug delivery systems for cancer chemotherapy. *Mol. Membr. Biol.* 2010; 27: 215-231.
- Sakamoto A, Tanaka Y, Yamada T, Kikuchi T, Muraoka O, Ninomiya K, Morikawa T, Tanaka R. Andriolides W–Y from the flower oil of andiroba (*Carapa guianensis*, Meliaceae). *Fitoterapia*. 2015; 100: 81-7.
- Samuel H, Alex C.McL, Christine P, Ryan McL. Amphotericin B Is Cytotoxic at Locally Delivered Concentrations. *Clinical Orthopedical Relat.* 2011; 469 (11): 3016-3021.
- San-Blas G, Niño-Vega G, Iturriaga T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med. Mycol.* 2002; 40: 225–242.
- Santos Filho D, Sarti SJ, Katz N, Araújo N, Filho R, A P, Abreu JE, Bortolin ME, Santos Filho D, Sarti SJ, Katz N, Araújo N, Filho R, A P, Abreu JE, Bortolin ME. Chemoprophylactic activity of soaps containing essential oil of *Pterodon pubescens* fruits in *Schistosomiasis mansoni*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1987; 82: 343–345.
- Santos AO, Ueda-Nakamura T, Filho D, Prado B, Junior VFV, Pinto AC, Nakamura CV. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2008; 103: 277–281.
- Santos AP, Zatta DT, Moraes WF, Bara MTF, Ferri PH, Silva MRR, Paula JR. Chemical composition, antimicrobial activity of essential oil and the occurrence of steroids in the leaves of *Pterodon emarginatus* Vogel, Fabaceae. *Rev. bras. farmacogn.* 2010; 20: 6.

- Schueffler A, Anke T. Fungal natural products in research and development. *Nat Prod Rep.* 2014; 31(10): 1425-48.
- Seidl C, Correia BL, Stinghen AEM, Santos CAM. Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Uleine from *Himatanthus lancifolius*. *Z. Für Naturforschung C.* 2010; 65: 440–444.
- Silva-Vergara ML, Martinez R, Camargo ZP, Malta MH, Maffei CM, Chadu JB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. *Med Mycol.* 2000; 38(3): 193-9.
- Shikanai-Yasuda MA. Paracoccidioidomycosis Treatment. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 2015; 57: 31–37.
- Shikanai-Yasuda MA, Filho T, Queiroz F de, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. Guideliness in paracoccidioidomycosis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2006; 39: 297–310.
- Soares FP, Cavalcante LF, Romero NR, Bandeira MAM. *Himatanthus Willd.* ex Schult. (Apocynaceae): Review. *Pharmacogn. Rev.* 2016; 10: 6–10.
- Soares DC, Portella NA, Ramos MF de S, Siani AC, Saraiva EM. Trans- β -Caryophyllene: An Effective Antileishmanial Compound Found in Commercial Copaiba Oil (*Copaifera* spp.). *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM.* 2013; 761323.
- Stratton LP, Dong, A, Manning MC, Carpenter JF. Drug delivery matrix containing native protein precipitates suspended in a polo-maxamer gel. *J. Pharm. Sci.* 1997; 86: 1006–1010.
- Svetaz LA, Postigo A, Butassi E, Zacchino SA, Sortino MA1. Antifungal drugs combinations: a patent review 2000-2015. *Expert Opin Ther Pat.* 2016; 26(4):439-53.
- Svetlichny G, Kulkamp-Guerreiro IC, Cunha SL, Silva FEK, Bueno K, Pohlmann AR, Fuentefria AM, Guterres SS. Solid lipid nanoparticles containing copaiba oil and allantoin: development and role of nanoencapsulation on the antifungal activity. *Pharm.* 2015; 70: 155–164.

Teixeira FB, Silva RB, Lameira OA, Webber LP, Couto RSD
RR. Copaiba oil-resin (*Copaifera reticulata* Ducke) modulates the

- inflammation in a model *BMC Complementaryofinjuryand to r Alternative Medicine*. 2017; 17:313.
- Teixeira MM, Theodoro RC, Oliveira FFM, Machado GC, Hahn RC, Bagagli E, San-Blas G, Felipe MSS. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. *Med Mycol*. 2014; 52 (1): 19-28.
- Terçarioli GR, Bagagli E, Reis GM, Theodoro CR, Bosco SMG, Macoris SAG, Richini-Pereira VB. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC Microbiology*. 2007; 7:92.
- Torchilin VP. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov*. 2014; 13: 813–827.
- Vale VV, Vilhena TC, Trindade RCS, Ferreira MRC, Percário S, Soares LF, Pereira WLA, Brandão GC, Oliveira AB, Dolabela MF, De Vasconcelos F. Antimalarial activity and toxicity assessment of *Himatanthus articulatus*, a plant used to treat malaria in the Brazilian Amazon. *Malar. J*. 2015; 14.
- Valera ET, Mori BM, Engel EE, Costa IS, Brandão DF, Nogueira-Barbosa MH, Queiroz RGP, Silveira VS, Scrideli CA, Tone LG. Fungal infection by *Paracoccidioides brasiliensis* mimicking bone tumor. *Pediatric blood & Cancer*. 2008; 50 (6): 1284–1286.
- Veiga Junior VF, Rosas EC, Carvalho MV, Henriques MG, Pinto AC. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulate* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne - A comparative study. *J. Ethnopharmacol*. 2007; 112 (2): 248-254.
- Venugopal J, Prabhakaran MP, Low S, Choon AT, Deepika G, Dev VRG, Ramakrishna S. Continuous nanostructures for the controlled release of drugs. *Curr. Pharm. Des*. 2009; 15: 1799–1808.
- Vieira GD, Alves TC, Lima SMD, Camargo LMA, Sousa CM. Paracoccidioidomycosis in a western Brazilian Amazon State: Clinical-epidemiologic profile and spatial distribution of the disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2014; 47.
- Wanat KA, Anadkat MJ, Klekotka PA. Seasonal variation of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis associated with trimethoprim-sulfamethoxazole. *J Am Acad Dermatol*. 2009; 60(4): 589-94.

- Wanke B, Aidê MA. Chapter 6 - Paracoccidioidomycosis. *J. Bras. Pneumol.* 2009; 35: 1245–1249.
- Yasuda MA. Pharmacological management of paracoccidioidomycosis. *Expert Opin Pharmacother.* 2005; 6(3): 385-97.
- Yoshida Y, Aoyama Y. Sterol 14 alpha-demethylase and its inhibition: structural considerations on interaction of azole antifungal agents with lanosterol 14 alpha-demethylase (P-450(14DM)) of yeast. *Biochemical Society Transactions.* 1991; 19(3):778-82.
- Zambuzzi-Carvalho PF, Tomazett PK, Santos SC, Ferri PH, Borges CL, Martins WS, Almeida Soares CM de, Pereira M. Transcriptional profile of *Paracoccidioides* induced by oenothien B, a potential antifungal agent from the Brazilian Cerrado plant *Eugenia uniflora*. *BMC Microbiol.* 2013; 13: 227.
- Zimmermam-Franco DC, Bolutari EB, Polonini HC, Carmo AMR do, Graças A. M. Chaves M das, Raposo NRB. Antifungal Activity of *Copaifera langsdorffii* Desf Oleoresin against Dermatophytes. *Molecules.* 2013; 18: 12561–12570.

Tabela I. Atividade biológica do óleo de andiroba, látex de janaúba e sucupira

Amostras	Isolados	CIM µg/mL	CFM	CC µg/mL	IS
Óleo andiroba	<i>Pb01</i>	>2000	>2000	>2000	Não enc.
	<i>Pb03</i>	>2000	>2000	>2000	Não enc.
	<i>Pb18</i>	>2000	>2000	>2000	Não enc.
	<i>Pb83</i>	>2000	>2000	>2000	Não enc.
Látex de Janaúba	<i>Pb01</i>	>2000	>2000	>2000	Não enc.
	<i>Pb03</i>	>2000	>2000	>2000	Não enc.
	<i>Pb18</i>	>2000	>2000	>2000	Não enc.
	<i>Pb83</i>	>2000	>2000	>2000	Não enc.
Óleo sucupira	<i>Pb01</i>	250	250	375	1,5
	<i>Pb03</i>	250	250		1,5
	<i>Pb18</i>	250	250		1,5
	<i>Pb83</i>	250	250		1,5

Concentração mínima inibitória (CIM) do crescimento fúngico; Concentração fungicida mínima (CFM); Concentração citotóxica (CC) do crescimento das células Balb/c 3T3; Índice de seletividade (IS); Não encontrado (Não enc.).

Tabela II. Percentual da atividade hemolítica do óleo sucupira

Atividade hemolítica (%)						
Óleo	2000	1000	500	250	125	62,5
	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL
Sucupira	0,54	0,43	0,12	0,23	0,03	0,05

Resultados obtidos da média de triplicados experimentais independentes.

Tabela III. Interação *in vitro* de sucupira com anfotericina B, sulfametoxazol + trimetoprima (SXT) e itraconazol em *Paracoccidioides* spp.

Sucupira + Anfotericina B				
	<i>Pb01</i>	<i>Pb 03</i>	<i>Pb18</i>	<i>Pb83</i>
CIM _A Sucupira	250	250	250	250
CIM _B Anfotericina B	0,75	0,75	0,75	0,75
CIM _A Combinado	125	125	125	125
CIM _B Combinado	0,37	0,37	0,37	0,37
CIF _A	0,5	0,5	0,5	0,5
CIF _B	0,5	0,5	0,5	0,5
CIF	1	1	1	1
Interação	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente
Sucupira + SXT				
	<i>Pb01</i>	<i>Pb03</i>	<i>Pb18</i>	<i>Pb83</i>
CIM _A Sucupira	250	250	250	250
CIM _B SXT	2,32	2,32	2,32	2,32
CIM _A Combinado	250	250	250	250
CIM _B Combinado	1,16	1,16	1,16	1,16
CIF _A	1	1	1	1
CIF _B	0,5	0,5	0,5	0,5
CIF	1,5	1,5	1,5	1,5
Interação	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente

Sucupira + Itraconazole				
	<i>Pb01</i>	<i>Pb03</i>	<i>Pb18</i>	<i>Pb83</i>
CIM _A Sucupira	250	250	250	250
CIM _B Itraconazol	0,003	0,003	0,003	0,003
CIM _A Combinado	125	250	250	250
CIM _B Combinado	0,003	0,003	0,003	0,003
CIF _A	0,5	1	1	1
CIF _B	1	1	1	1
CIF	1,5	2	2	2
Interação	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente

A concentração inibitória é mostrada em µg/mL. do composto A (CIM_A); CIM do composto B (CIM_B); CIM do composto A combinado dividido pelo CIM do composto A sozinho (CIF_A); CIM do composto B combinado dividido pelo CIM do composto B sozinho (CIF_B).