

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Lara Melo Campos**

**Estudos *in vitro* e *in vivo* de *Annona muricata* L. contra uma linhagem de *Candida albicans* multirresistente: atividade do extrato livre e incorporado a uma formulação a base de carbopol**

Juiz de Fora  
2022

**Lara Melo Campos**

**Estudos *in vitro* e *in vivo* de *Annona muricata* L. contra uma linhagem de *Candida albicans* multirresistente: atividade do extrato livre e incorporado a uma formulação a base de carbopol**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito à obtenção do título de Doutora.

**Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Luiz Fabri**  
**Co-orientador: Prof. Dr. Thiago Pereira da Silva**

Juiz de Fora  
2022

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Campos, Lara Melo.

Estudos in vitro e in vivo de *Annona muricata* L. contra uma linhagem de *Candida albicans* multirresistente: atividade do extrato livre e incorporado a uma formulação a base de carbopol / Lara Melo Campos. – 2022.

124 p.

Orientador: Rodrigo Luiz Fabri

Coorientador: Thiago Pereira da Silva

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2022.

1. *Annona muricata*. 2. *Candida albicans*. 3. Carbopol. 4. Candidíase. 5. Biofilme. I. Fabri, Rodrigo Luiz, orient. II. da Silva, Thiago Pereira, coorient. III. Título.

**Lara Melo Campos**

**Estudos *in vitro* e *in vivo* de *Annona muricata* L. contra uma linhagem de *Candida albicans*  
multirresistente: atividade do extrato livre e incorporado a uma formulação a base de carbopol**

Tese apresentada ao  
Programa de Pós-  
Graduação em  
Ciências  
Farmacêuticas  
da

Universidade  
Federal de Juiz de  
Fora como requisito  
parcial à obtenção do  
título de Doutora em  
Ciências  
Farmacêuticas. Área  
de concentração:  
Produtos Naturais e  
Sintéticos Ativos.

Aprovada em 22 de dezembro de 2022.

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr. Rodrigo Luiz Fabri** - Orientador  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Prof. Dr. Thiago Pereira da Silva** -  
Coorientador Universidade Federal de Juiz  
de Fora

**Prof. Dr. Vinícius Novaes Rocha**  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Prof. Dra. Juliana de Carvalho da Costa**  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Profa. Dra. Jéssica Leiras Mota Conegundes**

Nativa Pesquisa e Desenvolvimento LTDA

**Prof. Dr. Marcelo Gonzaga de Freitas Araújo**

Universidade Federal de São João Del-Rei

Juiz de Fora,

12/12/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Luiz Fabri, Professor(a)**, em 22/12/2022, às 14:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13](#)

[de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **JÉSSICA LEIRAS MOTA CONEGUNDES, Usuário Externo**, em 22/12/2022, às 16:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Gonzaga de Freitas Araújo, Usuário Externo**, em 22/12/2022, às 17:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543,](#)

[de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Pereira da Silva, Usuário Externo**, em 22/12/2022, às 18:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana de Carvalho da Costa, Professor(a)**, em 23/12/2022, às 07:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de](#)

[novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vinicius Novaes Rocha, Professor(a)**, em 23/12/2022, às 09:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Uf (www2.uf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1073811** e o código CRC **8DF65B59**.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por todas as oportunidades, amparo e luz durante toda trajetória. Agradeço aos meus pais, Sônia e Ari. Vocês foram fundamentais para minha formação, me dando todo amor, carinho, incentivo e sabedoria. À minha irmã Carolina e sobrinhas Elisa e Isis, por todo amor.

Sou muito grata ao meu orientador, Professor Dr. Rodrigo Luiz Fabri. 8 anos se passaram e com eles vieram muitos aprendizados, confiança, perseverança e principalmente amizade. Obrigada por todo apoio, paciência e por ter sido suporte nos momentos mais difíceis.

Tenho imensa gratidão aos meus amigos de laboratório, Ari, Priscila, Matheus, Lucas, Thalita, Olívia e Thayná, vocês foram fundamentais para tudo ser mais leve e divertido. Obrigada por serem a luz que eu muitas vezes precisei, pela torcida e carinho. Agradeço ao Laboratório de Bioensaios e todos meus colegas que fazem parte do grupo. Ao LPNB, em especial ao técnico Delfino, e à todos envolvidos no Departamento de Bioquímica por me auxiliarem no desenvolvimento dos experimentos e trocas de experiências.

Às minhas irmãs da vida, Isabela, Isabela, Alana, Camila, Luísa e Marcella. Nossa amizade é o laço mais forte que existe, obrigada por serem sempre presentes.

À Professora Priscila de Faria Pinto, agradeço a amizade, confiança e disposição em me ouvir e ajudar sempre que precisei. Ao Professor Thiago Pereira da Silva, do Laboratório de Biologia Celular, meu co-orientador, pela parceria nos experimentos, por ceder seu tempo e toda torcida e carinho por mim. Ao professor Marcelo Gonzaga, do Laboratório de Farmacologia de São João Del-Rei, pelos experimentos *in vivo* e por todo ensinamento a respeito da técnica. Ao professor Vinicius Novaes, do departamento de Medicina Veterinária, pelas análises histopatológicas. Ao professor Guilherme Diniz, do Laboratório de Desenvolvimento de Sistema Nanoestruturados, por ceder seu conhecimento que foram fundamentais na formulação. Ao professor Ângelo, pelas análises reológicas. Ao laboratório de microscopia eletrônica de varredura e transmissão da UFJF, em especial ao técnico Pedro, por toda paciência e dedicação com as minhas análises.

À Fapemig e CAPES, pelo apoio financeiro.

## RESUMO

Os produtos naturais bioativos têm se destacado como fontes de diversidade química, na busca de estratégias para a descoberta de novas drogas. Neste cenário, *Annona muricata* L. é utilizada tradicionalmente no tratamento de doenças inflamatórias, infecciosas e do câncer. No entanto, seu potencial antifúngico, bem como seu mecanismo de ação ainda carece de maiores estudos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica do extrato etanólico das folhas de *A. muricata* contra uma linhagem de *Candida albicans* (ATCC® 10231) multirresistente e desenvolver uma formulação a base de carbopol contendo o extrato, visando o tratamento de candidíase vulvovaginal (CVV). Os estudos em células planctônicas foram avaliados pela curva de crescimento, densidade celular, mecanismo de ação em envoltório celular e potencial de membrana mitocondrial. Os ensaios em biofilme, por meio da análise de proliferação e adesão, microscopia eletrônica de varredura, *whole slide imaging* e análise da composição da matriz polimérica extracelular. Os ensaios *in vivo* compreenderam modelos experimentais de CVV testando além de *A. muricata*, a sua forma incorporada ao carbopol. Nossas análises indicaram um promissor efeito inibitório de *A. muricata*, com capacidade de reduzir o crescimento fúngico, bem como a quantidade de célula. Diante dos estudos de envoltório celular, o extrato afetou tanto a membrana fúngica quanto a integridade da parede celular, alterando a viabilidade. Despolarização da membrana mitocondrial foi indicada após o tratamento com *A. muricata*. Em relação aos ensaios em biofilme, uma redução da proliferação, adesão e matriz polimérica de *C. albicans* foram observados. Os ensaios *in vivo* demonstraram que *A. muricata* livre e incorporado ao gel foram capazes de reduzir a carga fúngica, processo inflamatório e na presença do carbopol, uma potencialização de mucoadesividade. Sendo assim, *A. muricata* é potencial antifúngico na terapêutica para infecções por *C. albicans* e a formulação a base de carbopol apresentou capacidade de aplicações dermatológicas, proporcionando sua utilização futura para tratamento da CVV. Novos estudos de melhoramento do produto ainda serão realizados, sendo necessários para uma melhor compreensão do seu mecanismo e características físico-químicas.

**Palavras-chaves:** *Annona muricata*. *Candida albicans*. Carbopol. Candidíase. Biofilme fúngico.

## ABSTRACT

Bioactive natural products have stood out as sources of chemical diversity in the search for strategies for the discovery of new drugs. In this scenario, *Annona muricata* L. is traditionally used in the treatment of inflammatory, infectious and cancer diseases. However, its antifungal potential, as well as its mechanism of action, still needs further studies. The objective of this work was to evaluate the antifungal activity of the ethanolic extract of the leaves of *A. muricata* against a multidrug-resistant strain of *Candida albicans* (ATCC® 10231) and to develop a carbopol-based formulation containing the extract, aiming at the treatment of vulvovaginal candidiasis (VVC). Studies in planktonic cells were evaluated by the growth curve, cell density, mechanism of action in cell envelope and mitochondrial membrane potential. Analysis of the composition of the extracellular polymeric matrix. The in vivo assays comprised experimental VVC models testing, in addition to *A. muricata*, its form incorporated into carbopol. Our analyzes indicated a promising inhibitory effect of *A. muricata*, with the ability to reduce fungal growth, as well as the number of cells. In view of the cell envelope studies, the extract affected both the fungal membrane and the integrity of the cell wall, altering viability. Mitochondrial membrane depolarization was indicated after treatment with *A. muricata*. Regarding the biofilm assays, a reduction in proliferation, adhesion and polymeric matrix of *C. albicans* was observed. The in vivo assays demonstrated that *A. muricata* free and incorporated into the gel were able to reduce the fungal load, the inflammatory process and, in the presence of carbopol, an increase in mucoadhesiveness. Thus, *A. muricata* has antifungal potential in the treatment of *C. albicans* infections and the carbopol-based formulation showed the ability to be used in dermatological applications, providing its future use for the treatment of VVC. New product improvement studies will still be carried out, being necessary for a better understanding of its mechanism and physical-chemical characteristics.

**Keywords:** *Annona muricata*. *Candida albicans*. Carbopol. Candidiasis. Fungal biofilm.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Revisão Bibliográfica

<b>Figura 1</b> -	Taxonomia do gênero <i>Candida</i> . .....	17
<b>Figura 2</b> -	Formas morfológicas das espécies de leveduras do gênero <i>Candida</i> spp.. .....	18
<b>Figura 3</b> -	Mecanismos de resistência aos azóis. ....	20
<b>Figura 4</b> -	Mecanismo de ação às equinocandinas. ....	21
<b>Figura 5</b> -	Representação dos transportadores da família ABC ( <i>ATP-Binding Cassette</i> ) e do transportador MSF ( <i>Major Superfamily Facilitator</i> ). As principais bombas de efluxo descritas para as leveduras que apresentam resistência aos azólicos. ....	22
<b>Figura 6</b> -	Modelo de biofilme proposto para a <i>C. albicans</i> . ....	23
<b>Figura 7</b> -	Imagens de manifestação clínica de candidíase vulvovaginal. ....	26
<b>Figura 8</b> -	<i>Annona muricata</i> L. ....	29
<b>Figura 9</b> -	Principais acetogeninas presentes em <i>A. muricata</i> . ....	30

### Artigo 1

<b>Figure 1</b> -	Fungal growth of <i>C. albicans</i> cultures treated with ethanolic extract from <i>A. muricata</i> leaves (AME) and nystatin (NYS). ....	69
<b>Figure 2</b> -	Effect of ethanolic extract from <i>A. muricata</i> leaves (AME) and nystatin (NYS) on <i>C. albicans</i> crystal violet uptake (A) and nucleotide leakage (B). ....	70
<b>Figure 3</b> -	Activity of ethanolic extract from <i>A. muricata</i> leaves (AME) and nystatin (NYS) on free yeast cells stained with propidium iodide (PI) and analyzed by flow cytometry. ....	71
<b>Figure 4</b> -	Metabolic activity of <i>C. albicans</i> in planktonic cultures. ....	72

<b>Figure 5 -</b> Action of ethanolic extract from <i>A. muricata</i> leaves (AME) and nystatin (NYS) on the mitochondrial membrane potential of <i>C. albicans</i> . .....	73
---	----

## Artigo 2

<b>Figure 1 -</b> Effects of nystatin (NYS) and AME on the established and adherence of <i>C. albicans</i> biofilms by spectrophotometric analyses. ....	91
<b>Figure 2 -</b> Representative SEM images of AME-treated and untreated <i>C. albicans</i> . .....	92
<b>Figure 3 -</b> <i>C. albicans</i> biofilm formation and adhesion are inhibited by AME treatment. ....	93
<b>Figure 4 -</b> Photomicrographs of Hematoxylin and Eosin-stained longitudinal vaginal representative. ....	94

## Patente

<b>Figura 1 -</b> A) Curvas TGA e B) Curvas DTA para Carbopol puro, Carbopol +AME 1,0%, Carbopol +AME 2,5% e Carbopol +AME 5,0%. ....	114
<b>Figura 2 -</b> Varredura oscilatória da amplitude de deformação, de 0,5% a 500% (em escala logarítmica). ....	115
<b>Figura 3 -</b> Varredura oscilatória da frequência de deformação, de 0,0 a 628 rad/s (0,0 a 100 Hz, em escala logarítmica). ....	116
<b>Figura 4 -</b> Dependência da temperatura de $\eta^*$ no aquecimento para géis. ....	117
<b>Figura 5 -</b> Curvas de fluência em curto intervalo de tempo (0 a 2 s) para as quatro amostras. ....	117
<b>Figura 6 -</b> Parâmetros viscoelásticos obtidos por ajuste de dados de <i>creep ringing</i> usando o modelo de Jeffreys. ....	118
<b>Figura 7 -</b> Dados de MS no modo (+) ESI e os resultados da identificação dos compostos bioativos no extrato etanólico de <i>Annona muricata</i> (AME). ....	119

<b>Figura 8 -</b>	Número de animais infectados e quantificação da carga fúngica observada para animais tratados intravaginalmente com diferentes concentrações do gel e seus respectivos controles. ....	121
<b>Figura 9 -</b>	Fotomicrografias representativas de seções longitudinais da vagina coradas com hematoxilina e eosina. ....	122

## LISTA DE TABELAS

### Revisão Bibliográfica

<b>Tabela 1 -</b>	Principais fármacos antifúngicos e seus alvos celulares. ....	27
-------------------	---	----

### Artigo 1

<b>Table 1 -</b>	Compounds identified in the ethanolic extract from <i>A. muricata</i> leaves (AME) by UFLC-QTOF-MS in ESI (+). ....	66
<b>Table 2 -</b>	Quantification of total proteins after membrane leakage in fungal cells treated with ethanolic extract from <i>A. muricata</i> leaves (AME) and nystatin. ....	68
<b>Table 3 -</b>	<i>In vitro</i> antifungal activity of ethanolic extract from <i>A. muricata</i> leaves (AME) against <i>C. albicans</i> in the presence and absence of sorbitol and exogen ergosterol for the microtiter dilution broth assay. ....	68

### Artigo 2

<b>Table 1 -</b>	Experimental groups of animals. ....	89
<b>Table 2 -</b>	Extracellular components of the exopolysaccharide matrix of <i>C. albicans</i> biofilms treated with AME and Nystatin. ....	89
<b>Table 3 -</b>	Number of infected animals and quantification of fungal burden observed for animals treated intravaginally with different concentrations of AME and their respective controls. ....	90

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGEs	Acetogeninas
AME	Extrato etanólico das folhas de <i>Annona muricata</i>
AMP	Aminometilpropanol
ASD	Ágar sabouraud dextrose
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
CC	Controle de crescimento
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CRITT	Centro Regional de Inovação e Transferência de Tecnologia
CSD	Caldo sabouraud dextrose
CC	Controle de crescimento
CFU	<i>Colony forming unit</i>
CV	Cristal violeta
CVV	Candidíase vulvovaginal
CW	<i>Calcofluor white</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio-padrão
DO	Densidade óptica
DTA	Análise térmica diferencial
HBSS	<i>Hank's buffered salt solution</i>
FCCP	<i>(Trifluoromethoxy)phenylhydrazone</i>
GC	<i>Growth control</i>
IFM	Índice de fluorescência médio
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
IP	Iodeto de propídeo
LAG	Fase de latência
LOG	Fase exponencial
LVE	Viscoelasticidade linear

MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MIC	<i>Minimum inhibitory concentration</i>
MFC	<i>Minimum fungicidal concentration</i>
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NIS	Nistatina
NYS	<i>Nystatin</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução tampão de salina com fosfato
PMM	Potencial de membrana mitocondrial
PMNs	Polimorfonucleares
SEM	<i>Scanning electron microscopy</i>
TGA	Termogravimétrica
TMRE	Tetrametilrodamina
UFC	Unidade formadora de colônias
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UFLC-	<i>Ultra-fast liquid chromatography-Quadrupole time of flight mass</i>
QTOF-MS	<i>spectrometry</i>
UI	Unidade internacional
WSI	<i>Whole slide imaging</i>

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
2	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
2.1	GÊNERO <i>Candida</i> spp. ....	17
2.1.1	<b><i>Candida albicans</i></b> .....	19
2.2	<b>RESISTÊNCIA AOS FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS</b> .....	20
2.2.1	<b>Biofilme</b> .....	22
2.3	<b>CANDIDÍASE VULVOVAGINAL</b> .....	25
2.3.1	<b>Mecanismos de ação antifúngicos</b> .....	26
2.4	<i>Annona muricata</i> L. ....	28
2.5	<b>DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES</b> .....	32
2.5.1	<b>Carbopol</b> .....	33
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	34
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	42
3.1	OBJETIVO GERAL .....	42
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	42
4	<b>DIVISÃO DOS CAPÍTULOS</b> .....	43
5	<b>CAPÍTULO 1 - ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>A. muricata</i> CONTRA <i>C. albicans</i> MULTIRRESISTENTE: AÇÃO EM ENVOLTÓRIO CELULAR DE CÉLULAS PLANCTÔNICAS FÚNGICAS (ANEXO i)</b> .....	44
6	<b>CAPÍTULO 2 - ATIVIDADE ANTIBIOFILME DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>A. muricata</i>: ESTUDOS IN VITRO E IN VIVO EM UM MODELO DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL</b> .....	74
7	<b>CAPÍTULO 3 - PATENTE REFERENTE A UMA FORMULAÇÃO A BASE DE CARBOPOL CONTENDO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>A. muricata</i>, VISANDO O TRATAMENTO DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL</b> .....	95
7.1	RESUMO DA PATENTE .....	96
7.2	REIVINDICAÇÕES DA PATENTE .....	96
7.3	RELATÓRIO DA PATENTE .....	99
7.4	RESULTADOS DA PATENTE .....	114

<b>8</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>123</b>
	<b>ANEXO I .....</b>	<b>124</b>



## 1 INTRODUÇÃO

*Candida albicans* representa algumas doenças invasivas em humanos e gera altos custos de saúde em todo o mundo. Tais infecções são consideradas emergentes, principalmente na população imunocomprometida (CHEN et al., 2020).

Todavia, as escolhas terapêuticas atuais para o tratamento de infecções fúngicas invasivas são limitadas e estão associados à elevada toxicidade. O tratamento de patologias invasivas é desafiado pelo número restrito de drogas antifúngicas disponíveis, com apenas quatro classes diferentes de antifúngicos disponíveis para tratar um grande número de doenças associadas a fungos (LEE et al., 2021). Neste momento encontram-se na prática clínica quatro principais classes de antifúngicos: polienos, azóis, análogos de nucleósidos e equinocandinas (VAN DAELE et al., 2019).

Embora estes antifúngicos estejam disponíveis e utilizados na prática clínica, os patógenos fúngicos multirresistentes são um problema crescente para a saúde pública. Devido à alta incidência de infecções fúngicas causadas por espécies de *Candida* e sua crescente resistência aos tratamentos antimicrobianos, terapias alternativas como os produtos naturais têm sido estudadas (EKIERT e SZOPA, 2020).

Neste contexto, a natureza é conhecida desde a antiguidade por oferecer produtos de importância medicinal, sendo explorada no tratamento de diversas doenças (MUSHTAQ et al., 2018). Uma imensa reserva natural de compostos naturais é o Brasil, um dos países com a maior biodiversidade do mundo. Vinculado a esse arsenal, o país conta com ampla tradição do uso das plantas medicinais vinculada ao conhecimento popular transmitido entre gerações (CARNEIRO et al., 2014).

A relevância de estudos em compostos bioativos tem assumido um papel importante na descoberta e no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos com atividade antimicrobiana. Os estudos buscam novas alternativas em produtos naturais, considerados como uma das maiores fontes de diversidade química, o que permite analisar propriedades físico-químicas favoráveis e biológicas melhoradas, bem como reduzir efeitos colaterais. As pesquisas são exploradas em modelos biológicos adequados para a identificação de substâncias que sirvam de modelo para o desenvolvimento de novos medicamentos contra várias doenças fúngicas, incluindo candidíase (MUSHTAQ et al. 2018; LIU et al. 2017).

Os produtos naturais bioativos despertaram o interesse dos pesquisadores como bons candidatos a fármacos por apresentarem baixo potencial toxicológico e alta eficácia terapêutica (VALLI et al., 2018; VALLE, 2018). Em contrapartida, eles apresentam uma estabilidade limitada, dependendo das condições do meio, como a temperatura, luminosidade e pH. Como forma de melhorar as propriedades físico-químicas dos compostos bioativos e, possivelmente, suas atividades biológicas, o desenvolvimento de formulações mucoadesivas é amplamente utilizado pelas indústrias de cosméticos e medicamentos, visando aumentar a estabilidade química, a taxa de dissolução, permeabilidade de membrana e biodisponibilidade de moléculas de baixa solubilidade, potencializando o tratamento da candidíase vulvovaginal (GRAZIANO et al., 2021; SZENTE & SZEJTLI, 2004). Como alternativa, formulações com sistemas de entrega de drogas frequentemente utilizam o carbopol para criar géis biocompatíveis, possibilitando a vetorização das substâncias nos órgãos alvos e, principalmente, promovendo a mucoadesão necessária.

Destacamos neste trabalho a espécie *Annona muricata* L., comumente conhecida como graviola. Como alvo de estudo utilizamos as folhas, que tradicionalmente têm sido usadas no tratamento de algumas doenças, como hipertensão, malária, doenças inflamatórias, infecciosas e câncer (ABDUL WAHAB et al., 2018; GAVAMUKULYA, WAMUNYOKOLI e EL-SHEMY, 2017; KIM et al., 2020). As atividades biológicas presentes nas folhas estão relacionadas aos seus constituintes, que incluem principalmente s acetogeninas, compostos fenólicos, alcaloides e terpenos (LEITE et al., 2020). Entender o mecanismo de ação dessa espécie vegetal para as atividades tradicionalmente utilizadas pela população, como o tratamento de infecções fúngicas, se faz necessário.

Assim, como contribuição inédita dessa pesquisa, foram realizados estudos que possibilitam a investigação da atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* contra linhagens de *Candida albicans* multirresistentes, principalmente aos antifúngicos das classes azólicos e equinocandinas. Também, foi desenvolvida uma formulação contendo o extrato de graviola, visando ao tratamento de candidíase vulvovaginal.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 GÊNERO *Candida* spp.

Os microrganismos do gênero *Candida* spp. são eucarióticos desprovidos de pigmentos fotossintetizantes e possuem parede celular composta basicamente por glucanas, mananas, quitina e membrana plasmática fosfolipídica que contém vários esteróis, com predomínio do ergosterol (HALL, 2015). A classificação taxonômica é feita de acordo com a figura 1.

**Figura 1** - Taxonomia do gênero *Candida*.

Reino	<i>Fungi</i>
Divisão	Eumycota
Subdivisão	Saccharomycotina
Filo	Ascomycota
Classe	Saccharomycetes
Ordem	Saccharomycetales
Família	Saccharomycetidae
Genero	<i>Candida</i>

Fonte: Micobank.

São contabilizadas mais de 200 leveduras do gênero, estando presentes em uma grande variedade de nichos ecológicos, sendo que a grande maioria apresenta características saprofíticas, dentre as quais algumas fazem parte da microbiota humana e destas, somente 10% causam infecção (POLESELLO et al., 2017).

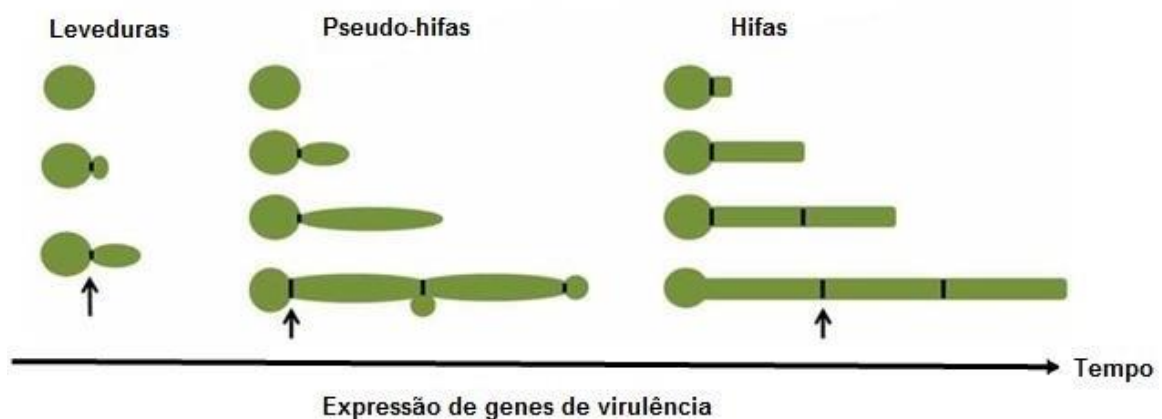
Algumas espécies deste gênero compreende microrganismos comensais, que fazem parte da microbiota de pessoas saudáveis. Essas leveduras colonizam com alta frequência o hospedeiro humano, sendo que cerca de 20 a 80% da população adulta saudável apresenta colonização do trato gastrointestinal. A colonização da mucosa bucal ocorre entre 20 a 40% das pessoas e entre as mulheres a colonização por *Candida* spp. na região vaginal ocorre entre 20 a 30% (RODRIGUEZ-CERDEIRA et al., 2020). As taxas de mortalidade em pacientes graves com infecções invasivas por *Candida* são altas, variando de 40% a 70%, dependendo da gravidade da infecção. Mesmo entre pacientes que recebem tratamento antifúngico, a taxa de mortalidade

pode chegar a 67% (RODRIGUEZ et al., 2017; SALSI et al., 2018). Mais de 90% das infecções invasivas são causadas por *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* (SALSI et al., 2018).

A forma de levedura é a colonizadora que se encontra presente na superfície das cavidades bucal, trato gastrointestinal e vaginal, entretanto, ela pode evoluir para forma de pseudo-hifa a fim de aumentar a captação de nutrientes presentes no meio em que se encontra, e posteriormente para hifa, que está comumente associada a candidíase oral, gastrointestinal e vulvovaginal, devido a uma maior expressão de genes de virulência (Figura 2). Isto acontece devido a capacidade da forma de hifa em atravessar as barreiras epiteliais e evadir o sistema imune (POLKE, HUBE e JACOBSEN, 2015; VILLA et al., 2020).

A transformação do fungo de comensal para patogênico ocorre principalmente em pacientes no ambiente hospitalar, onde tem-se o aumento do número de procedimentos invasivos, o uso intensivo de antimicrobianos de amplo espectro e o maior número de pessoas imunocomprometidas. As diversas espécies do gênero apresentam variados graus de patogenicidade e sensibilidade a antifúngicos e podem desenvolver mecanismos de resistência aos principais antifúngicos disponíveis para uso clínico contra infecções, dificultando e limitando o tratamento (VILLA et al., 2020).

**Figura 2** - Formas morfológicas das espécies de leveduras do gênero *Candida* spp.



Fonte: Adaptado de Chen e colaboradores (2020)

Legenda: Transição da forma de levedura até a forma hifal e, conseqüentemente, o aumento da expressão dos genes de virulência com o decorrer do tempo.

### 2.1.1 *Candida albicans*

*C. albicans* apresenta diferentes aspectos, entre eles, o pleomorfismo. A fase unicelular leveduriforme pode formar hifas verdadeiras. O fungo ainda pode exibir uma variedade de morfologias durante seu crescimento, formando assim as pseudo-hifas (HALL, 2015; POLESELLO et al., 2017). Enquanto a hifa é a morfologia que melhor transpõe barreiras, devido ao seu desenvolvimento filamentosos, a fase leveduriforme, por sua morfologia arredondada, é a melhor para a disseminação eficiente. Em geral, a forma de levedura predomina durante a colonização no hospedeiro sadio, enquanto as hifas surgem frente a deficiência do sistema imune. Portanto, ambas as formas são de grande importância na patogênese, uma vez que elas são requeridas em diferentes situações no hospedeiro (POLKE, HUBE e JACOBSEN, 2015; VILLA et al., 2020; CHEN et al., 2020).

Apesar de pertencer a microbiota humana, *C. albicans* é responsável por mais de 400.000 infecções fúngicas invasivas em todo o mundo e é a quarta causa mais prevalente de todas as infecções da corrente sanguínea (PAPPAS et al., 2018; NOBLE, GIANETTI E WITCHELEY 2017). A gravidade da infecção fúngica é frequentemente dependente do estado imunológico do hospedeiro, com infecções da mucosa ocorrendo em indivíduos saudáveis e infecções da corrente sanguínea em hospedeiros imunocomprometidos. A maioria dessas infecções está associada à *C. albicans* (RIBEIRO et al., 2020; RODRIGUES, RODRIGUES E HENRIQUES, 2019).

Esta espécie possui fatores de virulência que auxiliam na infecção, como: aderência às células do hospedeiro pelas adesinas, por meio de diferentes glicoproteínas de superfície celular implicadas no processo de adesão em superfícies do hospedeiro (TALAPKI et al., 2020; McCALL et al., 2019; CAVALHEIRO e TEIXEIRA, 2018); pleomorfismo fúngico (CHEN et al., 2020; TALAPKO et al., 2021); variação fenotípica (SOLL, LOCKHART e ZHAO, 2003; CALDERONE e FRONZI, 2001); sobrevivência dentro de fagócitos (JONG et al., 2001); modulação do sistema imune (por meio de mananas e manoproteínas são capazes de regular a ação das defesas do hospedeiro) (TALAPKO e ŠKRLEC, 2020); adaptação ao ambiente oxidativo (HROMATKA, NOBLE e JOHNSON, 2005); sequestro de ferro, principalmente na candidemia (KNIGHT et al., 2005); variação de temperatura e do pH, componentes cruciais para adaptação a diferentes sítios no hospedeiro (ODDS, 1993); toxinas (MOYES et al., 2016); e enzimas hidrolíticas, as principais enzimas

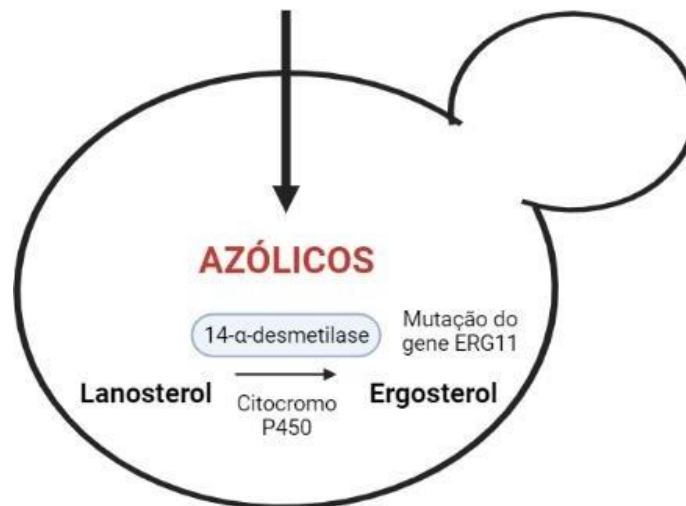
produzidas são as proteinases, que hidrolisam ligações peptídicas, e as fosfolipases, que hidrolisam os fosfoglicerídeos (WIBAWA, 2016).

## 2.2 RESISTÊNCIA AOS FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS

O uso generalizado e prolongado de antifúngicos no tratamento de infecções causadas por *Candida* spp. tem levado ao surgimento de resistência. Isto acontece porque as células fúngicas podem se adaptar a presença dos antifúngicos por meio de mutações dos alvos moleculares dos fármacos, por meio da expressão de proteínas alvo e de bombas de efluxo (PARENTE-ROCHA et al., 2017).

A resistência da *Candida* sp. frente aos derivados azólicos ocorre pelos seguintes mecanismos: mutação do gene ERG11, que codifica a enzima 14- $\alpha$ -desmetilase, modificando o alvo de ação antifúngico e assim não haverá interação com o fármaco (Figura 3). Além da super expressão desse gene, que resulta na produção excessiva da enzima alvo, criando a necessidade de maiores concentrações de fármacos dentro da célula (Figura 3) (PFALLER, 2012).

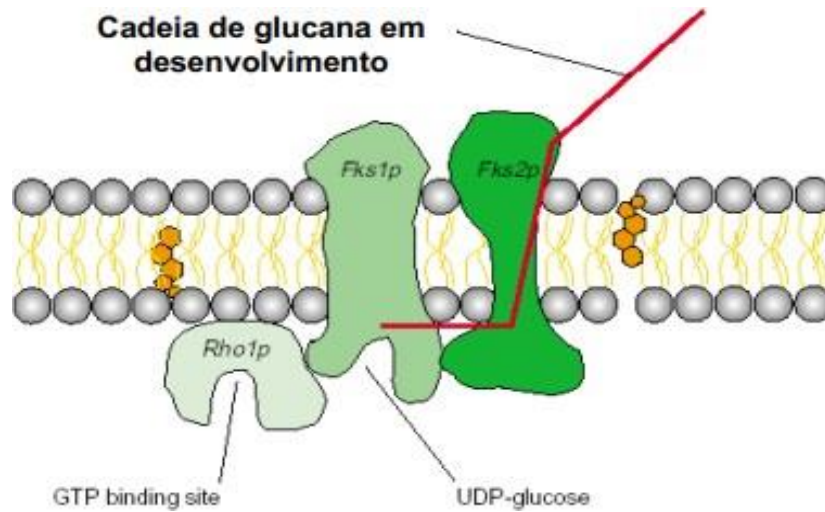
**Figura 3 - Mecanismos de resistência aos azólicos**



Fonte: Elaborado pela autora (2022).  
 Legenda: Mutaçao do gene ERG11

O mecanismo de resistência às equinocandinas são diretamente ligados a mutações do gene FKS1, que codifica  $\beta$  - (1,3) - D-glucano sintetase, afetando assim a síntese  $\beta$  - (1,3) glucanas (Figura 4) (PFALLER, 2012).

**Figura 4 - Mecanismo de ação às equinocandinas.**

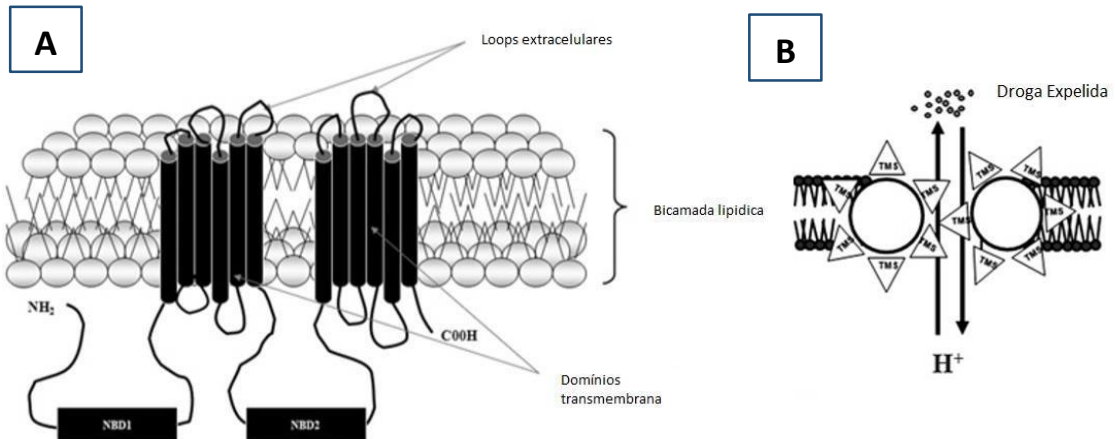


Fonte: ODDS, BROWN e GOW, 2003.

Legenda: Mutação no gene FKS.

Para os demais, incluindo os azólicos e as equinocandinas, as bombas de efluxo multidrogas tem sido o mecanismo de resistência mais comumente mencionado. Elas são proteínas que possuem mecanismo de transporte ativo que retiram o fármaco de dentro da célula garantindo, assim, sua sobrevivência (PRASAD e RAWAL, 2014). Os transportadores da família ABC (*ATP-Binding Cassette*, codificadas pelo gene CDR) e os transportadores MSF (*Major Superfamily Facilitator*, codificadas pelo gene MDR) são proteínas envolvidas no efluxo de fármacos por atuarem nas leveduras do gênero *Candida spp.* Os transportadores da família ABC possuem dois domínios citosólicos denominados de NBDs (*Nucleotide Binding Domains*), que são responsáveis pela hidrólise de ATP, o que facilita a retirada do fármaco do meio intracelular (Figura 5A). Por outro lado, os transportadores MFS não utilizam a hidrólise de ATP, mas um gradiente de prótons para expelir os fármacos (Figura 5B) (PANWAR, PASRIJA e PRASAD, 2008; PFALLER, 2012).

**Figura 5** - Representação dos transportadores da família ABC (*ATP-Binding Cassette*) e do transportador MSF (*Major Superfamily Facilitator*). As principais bombas de efluxo descritas para as leveduras que apresentam resistência aos azólicos.



Fonte: Adaptado de PANWAR, PASRIJA e PRASAD, 2008.

Legenda: (A) Transportador *ATP-Binding Cassette* mostrando os domínios citosólicos dentro do citoplasma (NBDs) e os domínios transmembrana instalados na membrana plasmática da célula fúngica. (B) Transportador *Major Superfamily Facilitator* instalado na membrana da célula fúngica mostrando o efluxo de uma droga antifúngica por meio da diferença de gradiente de prótons.

### 2.2.1 Biofilme

Atualmente é preocupante a possibilidade de formação de comunidades microbianas mistas aderidas à superfícies bióticas ou abióticas densamente povoadas, conhecidas como biofilmes. Estas são comunidades complexas produzidas à medida que os microrganismos criam seus próprios habitats, formadas por uma ou várias espécies fúngicas e permitem que os microrganismos sobrevivam em ambientes hostis (FROZI, ESPER e FRANCO, 2017).

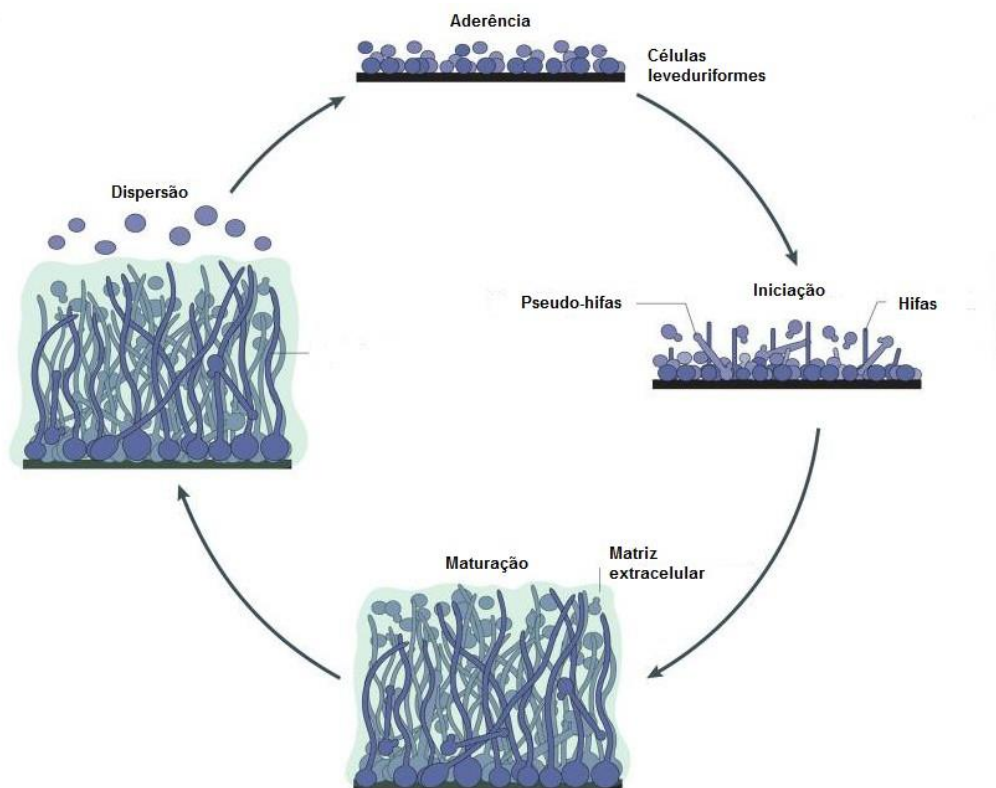
A primeira etapa do processo de instalação das células fúngicas é a identificação e ligação às células do hospedeiro. Esta ligação é conhecida como adesão e pode ocorrer tanto em superfícies bióticas como abióticas, conduzindo a formação de biofilmes. A aderência à superfície da célula hospedeira no organismo é o primeiro passo na patogênese de *C. albicans*, permitindo a colonização do fungo em um nicho específico e o desenvolvimento do processo de infecção (RIBEIRO et al., 2020).



O início da adesão é controlado por fatores não específicos como as forças eletrostáticas e hidrofobicidade, promovido pelas proteínas específicas da superfície das células fúngicas denominadas adesinas. As adesinas irão se ligar aos aminoácidos e açúcares das células do hospedeiro ou às superfícies e assim promover o fenômeno de adesão (TALAPKO et al., 2021).

A segunda etapa é a proliferação de leveduras por meio de projeções de formas alongadas que irão originar as hifas ou pseudo-hifas. Em seguida tem-se a maturação dos biofilmes onde ocorre o prolongamento contínuo das hifas sendo, nesta etapa, que se começa a desenvolver a resistência aos antifúngicos. Por fim, a quarta e última etapa é denominada de dispersão, onde finalmente, as leveduras se desprendem espontaneamente do biofilme maduro, espalhando-se para outras partes e desencadeando novas membranas biológicas. visto que se dá a liberação para o meio de células fúngicas não aderentes. Todas as etapas ocorrem de forma simultânea (Figura 6) (GUO et al., 2017; TALAPKO et al., 2021)

**Figura 6 - Modelo de biofilme proposto para a *C. albicans*.**



Fonte: Adaptado de Lohse e colaboradores (2018).

Legenda: Células planctônicas se ligam a superfície. As células aderidas começam a se desenvolver em biofilmes. O desenvolvimento do biofilme leva ao biofilme maturado que inclui o mistura de células de levedura, hifas e matrix exopolissacarídea. Posteriormente há dispersão das células do biofilme maduro.

Os biofilmes compreendem uma matriz exopolissacarídea (EPS), que é responsável pela coesão e adesão das células às superfícies e canais para a circulação de nutrientes (SOLL e DANIELS, 2016; FROZI, ESPER e FRANCO, 2017). A matriz pode proteger efetivamente *C. albicans* da fagocitose das células imunes do hospedeiro, prevenir drogas antibacterianas e prejudiciais, inibir substâncias e manter a estabilidade dos nutrientes no biofilme. As EPSs também atuam como barreiras de proteção para células microbianas em biofilmes, aumentando sua tolerância a estresses ambientais, tais como dessecação, pressão osmótica, radiação ultravioleta, sanitizantes e tratamentos antimicrobianos (KIM et al., 2017; WALL et al., 2019).

A patogenicidade de *Candida* spp. é mediada por uma série de fatores de virulência, um dos quais é a formação de biofilmes. A troca fenotípica é um fenômeno tipicamente associado à capacidade de formar biofilmes, sendo uma alteração morfológica reversível de células de levedura unicelulares conhecidas como blastosporos em pseudo-hifas filamentosas e hifas, que formam o biofilme. Vaginas de mulheres assintomáticas são colonizadas por fugos planctônicos, enquanto que um biofilme é formado no caso de vaginites sintomáticas (PEREIRA et al., 2021)

Nas últimas décadas, a incidência de infecções microbianas correlacionadas com a formação de biofilme chega a 65% dos casos (RODRIGUEZ-CERDEIRA et al., 2020). Todas as variantes morfológicas conhecidas: leveduras, pseudo-hifas e hifas podem crescer em biofilme e geralmente expressam propriedades diferentes das suas respectivas células planctônicas. A produção de proteases é maior durante a formação de biofilme. Além disso, as células de *C. albicans* expressam diversos genes que influenciam na patogenicidade e os produtos desses genes participam nos mecanismos de adesão, síntese de carboidratos, resistência às drogas como as bombas de efluxo, por exemplo e no *quorum sensing*, caracterizado como um mecanismo de comunicação intra e interespecies microbianas que propicia aos microrganismos expressarem alterações fenotípicas marcantes quando estes se encontram em altas densidades populacionais (FOX et al., 2015).

Os mecanismos responsáveis pela resistência a antifúngicos em relação aos biofilmes estão relacionados com limitações difusionais da passagem do agente antimicrobiano pela matriz extracelular, com alterações fenotípicas das células no biofilme e ainda com o desenvolvimento de mecanismos de resistência por alteração do genótipo das células (GULATI e NOBILE, 2016; PEREIRA et al., 2021). Outro mecanismo proposto para a resistência do biofilme aos agentes antimicrobianos é que

as células associadas ao biofilme crescem significativamente mais devagar do que as células planctônicas e, como consequência, captam os agentes antimicrobianos mais lentamente. A estratégia de biofilme contribui para resistência de *Candida* spp. (ATRIWAL et al., 2021).

Consequentemente, é importante desenvolver agentes antifúngicos com um novo modo de atividade fungicida contra biofilmes de *Candida* spp. e que não provocariam um rápido desenvolvimento de mecanismos de resistência.

### 2.3 CANDIDÍASE VULVOVAGINAL

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma infecção da vulva e vagina causada pelo crescimento anormal de espécies de *Candida* spp. Esta condição é uma das mais comuns diagnosticadas na prática ginecológica e a segunda infecção genital mais comum (RODRIGUEZ-CERDEIRA et al., 2020).

Esta patologia representa um sério desafio à saúde pública. Cerca de 70-75% das mulheres sofrem pelo menos um episódio de CVV durante suas vidas, e metade evoluirão em recorrência. Evidências mostram que essa doença é recorrente em quase 8% das mulheres 15 a 50 anos. A recorrência é definida como quatro ou mais episódios de doença por ano. Vários estudos relataram que *C. albicans* continua a ser a espécie mais frequentemente e isolada em CVV (76-89%) (YAN et al., 2018).

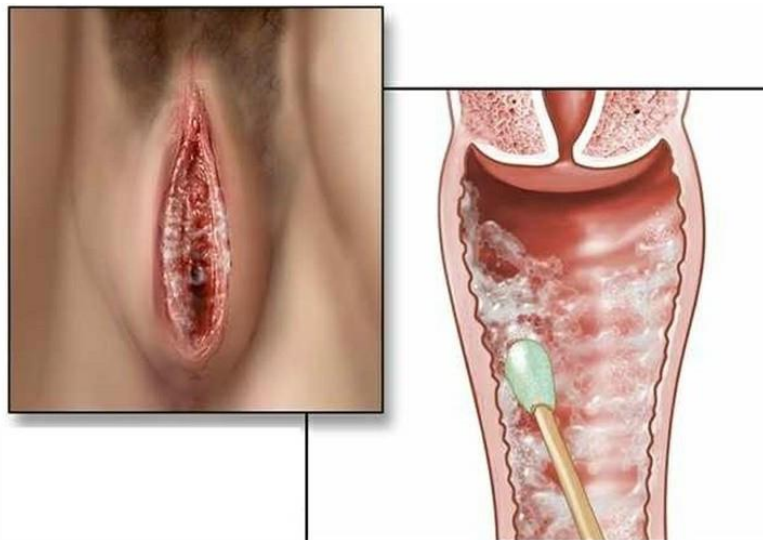
A infecção sintomática pode resultar de inflamação exacerbada da mucosa causada principalmente por crescimento excessivo de fungos na vagina e subsequente invasão epitelial e produção de fatores de virulência. Os sintomas comuns da doença incluem coceira, queimação, dor e vermelhidão vaginal. Frequentemente, eles são acompanhados por um corrimento vaginal que consiste em epitélio descamado, células do sistema imunológico, levedura e fluido vaginal (WILLEMS et al., 2020). Estes sinais e sintomas não são específicos da CVV e o diagnóstico deve ser confirmado por exames laboratoriais, como a microscopia com exame de amostras vaginais frescas e o teste do hidróxido de potássio a 10% (KOH) (MÂRDH et al., 2002).

Acredita-se que o início da maioria dos casos de CVV esteja associado a uma ampla gama de fatores predisponentes ou eventos desencadeantes do uso de antimicrobianos, aumento dos níveis de estrogênio (por exemplo, contraceptivos orais

de alto estrogênio, terapias de reposição hormonal, gravidez), diabetes mellitus descontrolado e atividades sexuais (YANO et al., 2019).

O processo inflamatório está associada à falha dos polimorfonucleares (PMNs) em remover o patógeno da mucosa vaginal devido a um estado de anergia. Incapazes de efetuar suas funções antimicrobianas e protetoras, os PMNs conseqüentemente morrem e liberam seus grânulos com mediadores inflamatórios, que irão levar ao quadro inflamatório observado na candidíase. Assim, a presença de PMNs é amplamente relacionada a condição inflamatória observada na CVV (YANO et al., 2018).

**Figura 7** - Imagens de manifestação clínica de candidíase vulvovaginal.



Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Legenda: (A) Colonização externa da região vulvovaginal. (B) Colonização interna da região vulvovaginal.

### 2.3.1 Mecanismos de ação dos antifúngicos

O tratamento das infecções causadas por leveduras do gênero *Candida* spp. é feito por meio do uso de antifúngicos. Ainda há uma escolha limitada entre as classes antifúngicas, tais como os azóis, equinocandinas, polienos e análogos de pirimidina. Eles são os mais utilizados na prática clínica e após descobertos, nenhuma outra classe foi evidenciada (Tabela 1) (CASTELLI et al., 2014; DENNING e BROMLEY, 2015; CAMPOY e ADRIO 2017).

**Tabela 1** - Principais fármacos antifúngicos e seus alvos celulares.

<b>Classe</b>	<b>Fármaco</b>	<b>Alvo</b>	<b>Atividade contra <i>Candida spp.</i></b>
<b>Polienos</b>	Nistatina	Ergosterol	Fungicida
	Anfotericina B		
<b>Azóis</b>	Fluconazol	Síntese de ergosterol	Fungistático
	Itraconazol		
	Voriconazol		Fungicida
	Posaconazol		
<b>Equinocandinas</b>	Caspofungina	Síntese de $\beta$ - (1,3) - D-glucano	Fungicida
	Micafungina		
	Anidulafungina		
<b>Análogos de pirimidina</b>	Flucitosina	Síntese de DNA e RNA	Fungistático

Fonte: Adaptado de Sardi e colaboradores (2013).

Os azóis são classificados em: imidazóis (apresentam duas moléculas de nitrogênio do anel azólico) como miconazol, cetoconazol e econazol; triazóis (três moléculas de nitrogênio no anel azólico), tais como fluconazol, itraconazol; e os triazóis de última geração, como o voriconazol e posaconazol. Eles são amplamente utilizados para o tratamento de infecções superficiais e invasivas, devido à sua farmacocinética favorável e segurança. Tem como alvo de ação a biossíntese do ergosterol, um componente importante da membrana fúngica, inibindo a enzima 14 $\alpha$ -esterol desmetilase (CYP51). O esgotamento do ergosterol e acúmulo de metilesteróis tóxicos na membrana resultam na alteração da fluidez da membrana juntamente com a interrupção da atividade de enzimas ligadas à membrana levando à inibição crescimento e replicação do fungo (ANEJA et al., 2016; CAMPOY e ADRIO 2017).

A equinocandina é a classe mais recente de fármacos antifúngicos, compreendendo a caspofungina, micafungina e a anidulafungina como as principais. É uma classe de antifúngicos altamente seletivos de lipoproteínas que inibem a síntese das  $\beta$ -(1,3)-glucanas, constituintes da parede celular fúngica. Desta forma, irá causar o aumento da vulnerabilidade à lise osmótica levando, por fim, à morte da célula fúngica (VAN DAELE et al., 2019).

O mecanismo de ação dos polienos tem como alvo a membrana citoplasmática, mais precisamente o ergosterol (esterol principal), fazendo com que haja um aumento da permeabilidade da membrana celular por produção de poros aquosos permitindo,

assim, a alteração do equilíbrio eletrolítico. Estas alterações irão resultar na morte da célula fúngica (SPAMPINATO e LEONARDI, 2013; PARAMYTHIOTOU et al., 2014).

A anfotericina B e a nistatina são as principais representantes desta classe e apresentam uma ação análoga sobre as membranas celulares dos fungos. Estes dois fármacos antifúngicos possuem duplas ligações múltiplas e conjugadas, que as fazem interagirem preferencialmente com o ergosterol, em vez de reagirem com o colesterol das membranas celulares dos mamíferos. Estes agentes induzem a lise celular com consequente morte da célula. Por esse motivo os poliênicos possuem amplo espectro de ação, possuindo ação fungicidas (ANDERSON et al., 2014; NETT e ANDES, 2016).

Finalmente, os analagos de pirimidina, representados pela flucitosina, tem como alvo o metabolismo de material genético, alterando a síntese de proteínas (CAMPOY e ADRIO 2017).

#### 2.4 *Annona muricata* L.

*A. muricata* L. popularmente conhecida como graviola é uma planta distribuída em áreas da América Central e do Sul, África e sudeste Ásia. É membro da família *Annonaceae* que compreende aproximadamente 130 gêneros e 2300 espécies. Se apresenta como uma pequena árvore verde de altura que varia de 4 a 8 m e produz fruto verde espinhoso (Figura 8). A casca, os frutos, as sementes e as folhas são amplamente utilizadas na medicina popular para o tratamento de uma grande variedade de doenças tais como câncer, malária, diabetes, parasitoses, entre outras (CHANA et al., 2019; NUGRAHA et al., 2019).

**Figura 8 - *Annona muricata* L.**

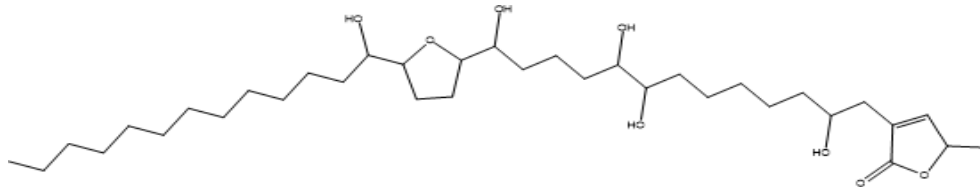


Fonte: Adaptado de Abdul Wahab e colaboradores (2018).  
 Legenda: (A) Árvore; (B) Folhas; (C) Fruto.

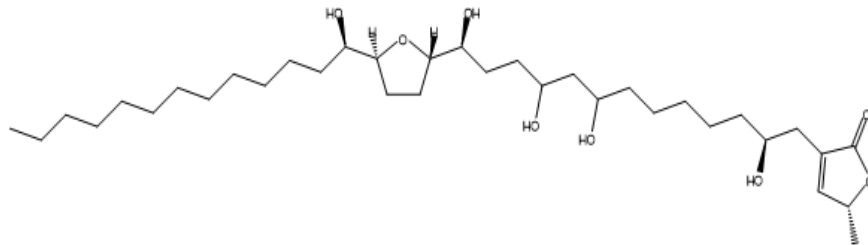
Os compostos de grande prevalência em *A. muricata* são as acetogeninas (AGEs) anonáceas. As AGEs são uma classe única de metabolitos secundários derivados de ácidos graxos de cadeia longa da via dos policetídeos. Caracterizam-se geralmente por uma combinação de ácidos graxos com uma unidade de 2-propanol no C-2 que forma um grupamento substituído metil  $\alpha,\beta$ -insaturado  $\gamma$ -lactona (ABDUL WAHAB et al., 2018). A literatura relata diversas atividades biológicas para as AGEs, incluindo atividades antimaláricas, antiparasitárias e pesticidas. Contudo, as atividades biológicas das AGE's são principalmente relacionadas à toxicidade contra as células cancerosas e efeitos inibidores contra o complexo mitocondrial. (MOGHADAMTOUS et al., 2015). Ao longo dos anos alguns constituintes foram isolados, como anomuricina A, anomuricina B, anomuricina C, muricatocina A, muricatocina B e muricatocina C (WU et al., 1995a, b, c). Zeng et al. (1996) isolaram anopentocina A, anopentocina B, anopentocina C, cis-anomuricina-D-onas e trans-anomuricina-D-onas das folhas de *A. muricata*. Anonacina, anonacina A, anonacina B, anonacina-10-ona, muricatalicina e muricatalina foram isoladas e identificadas por Yu e colaboradores (1997) (Figura 9).

**Figura 9 - Principais acetogeninas presentes em *A. muricata***

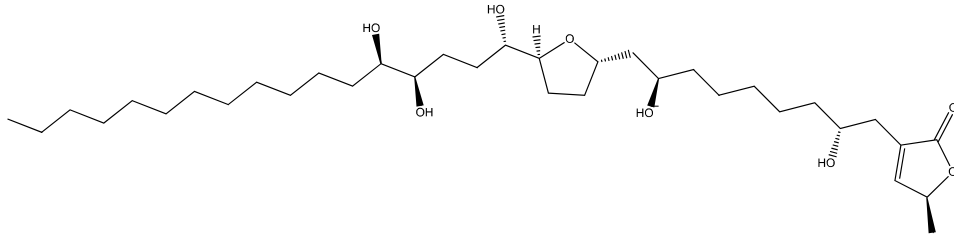
a)



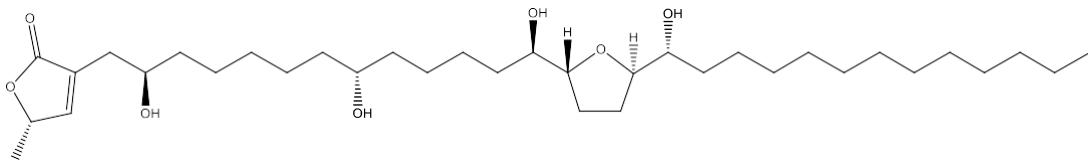
b)



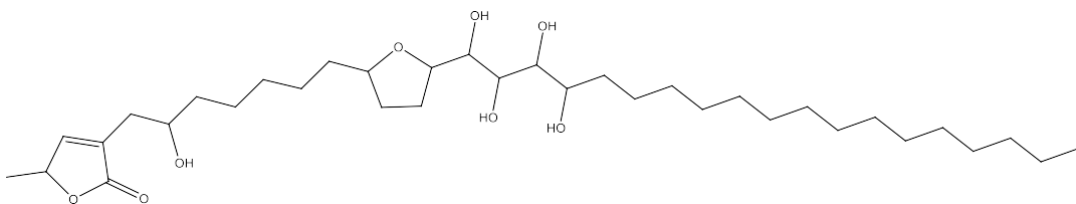
c)



d)



e)



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: a) Anomuricina; b) Muricatocina; c) Anopentocina; d) Anonacina; e) Muricatalina.



Segundo o National Cancer Institute (NCI) as AGEs ligam-se ao(s) sítio(s) catalítico(s) da ubiquinona no NADH mitocondrial: ubiquinona oxidoreductase (complexo I) e bloqueiam a cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria. Além disso, as AGEs se ligam e bloqueiam a atividade da NADH oxidase ligada à ubiquinona, uma enzima superexpressada nas membranas plasmáticas das células cancerosas. Isso inibe a produção de trifosfato de adenosina (ATP), diminuindo seu nível intracelular e induz a apoptose das células tumorais. Em comparação com as células normais, as células cancerosas têm maiores demandas de ATP. As AGEs também inibem a glicose desidrogenase microbiana.

Verificou-se que as AGEs purificadas, tais como anocatacina ou anocatalina, induzem citotoxicidade significativa em células cancerosas hepáticas de Hep G2 e Hep 2,2,15 *in vitro*. No cancer de mama, a citotoxicidade pode ser induzida em células MCF-7 usando diversar AGE's purificada. As AGE's induzem citotoxicidade em uma variedade de outros cânceres como o de próstata, colorretal, pulmonar, leucemia, renal, pancreática, hepática, e cancros orais. Sendo verificado que o extrato etanólico das folhas de *A. muricata*, induzem uma maior toxicidade em células MCF-7 e MDA, COLO-205 e DLD-1 colorrectal, H-460 de pulmão, K562 leucémico e ECV-304. (RADY et al., 2018)

Diversos estudos apontam que as folhas de *A. muricata* são uma importante fonte de flavonóides. Geralmente, os flavonóides encontrados nas folhas de *A. muricata* estão sob a forma de flavonóides glicosilados ou flavonóides glicosídeos. Esses compostos possuem ação antioxidante, combatendo radicais livres, propriedades que são conferidas pelos grupos fenólicos OH, e as duplas ligações presentes na sua estrutura química fundamental. (MANRIQUE-DE-LA-CUBA et al., 2019). Na literatura encontramos a rutina, campferol-3-O-rutinosídeo e campferol-3-O-robinobiosídeo como os flavonoides mais encontrados (YANG et al., 2015)

Fofana et al. (2012) realizou uma investigação mais aprofundada sobre o conteúdo de alcalóides das folhas de *A. muricata* usando cromatografia em coluna de sílica gel. A reticulina e a cureximina são os alcalóides mais abundantes em *A. muricata* (LEBOEUF et al., 1982), e as folhas continham a maior concentração de alcalóides em comparação com as raízes, caules e frutos (FOFANA et al., 2012).

*A. muricata* tornou-se um tema interessante na procura de novos agentes terapêuticos. Estudos recentes realizados por Pinto e colaboradores. (2017) investigaram a ação antibacteriana do extrato metanólico de folhas de *A. muricata*

(LMA). LMA foi testado contra várias cepas de bactérias, sendo ativa contra bactérias gram-negativas e gram-positivas, ressaltando uma maior atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* e *Enterococcus faecalis*.

## 2.5 DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES

A primeira fase do desenvolvimento de uma formulação é gerar uma ideia promissora que irá direcionar para a elaboração do produto que apresente vantagens e melhoramento em todos os aspectos para o consumidor final. É necessário compreender os mecanismos de ação dos compostos que irão compor a formulação e avaliar processos envolvidos no desenvolvimento do produto (COSTA et al., 2018).

Cada substância apresenta características específicas que devem ser consideradas antes do desenvolvimento da formulação, como por exemplo a solubilidade, a velocidade de dissolução e a forma das partículas. Para substâncias que oxidam com facilidade, por exemplo, deve-se adicionar o adjuvante farmacotécnico antioxidante. Assim como para os que sofrem degradação na presença de luz, a fotoproteção deve ser garantida para evitar a decomposição (VOGEL et al., 2020).

Dentre os métodos, a aplicação de formulações tópicas com propriedades mucoadesivas é amplamente aceita para o tratamento de candidíase vulvovaginal. A penetração na pele de substâncias ativas após aplicação tópica é diretamente proporcional à suas propriedades mucoadesivas. A baixa solubilidade no veículo é uma limitação para a maioria das substâncias ativas em preparações tópicas (THAPA et al., 2020).

O potencial químico de uma substância pode ser aumentado utilizando formulações que utilizam de tecnologias que tem como objetivo melhorar a solubilidade do produto em meio aquoso, a biodisponibilidade dos compostos ativos através do aumento da estabilidade química, vetorização das substâncias nos órgãos alvos, protegendo contra fixação em tecidos e órgãos indesejados, o que tende a reduzir efeitos tóxicos, além de contribuir para redução dos custos de produção (RUDNICKA et al., 2021).

### 2.5.1 Carbopol

O Carbopol é um polímero derivado de poli(ácido acrílico) de alto peso molecular. Devido à sua hidrofiliçidade e não reatividade com outros componentes em uma fórmula, tem sido utilizado pela indústria farmacêutica em formulações líquidas e semi-sólidas, como agente espessante, emulsionante, viscosificante, suspensor ou gelificante e principalmente, mucoadesivo (GRAZIANO et al., 2021; SHAFIEI et al., 2018).

Na sua forma granulada, a molécula do carbopol é extremamente enovelada. Quando hidratada, a molécula forma uma dispersão aquosa cujo pH varia entre 2,8 e 3,2. Os grupos carboxílios (COOH) da cadeia principal se dissociam em um COO<sup>-</sup>, fixo na cadeia principal e um H<sup>+</sup> livre no meio. A atração eletrostática mantém os íons livres aprisionados entre as cadeias do polímero e aumenta a pressão osmótica do sistema. Para obter o espessamento é necessária a neutralização com bases, como o hidróxido de sódio ou aminometilpropanol (AMP) (CORRÊA et al., 2005). Com a elevação do pH, os grupos carboxílicos se ionizam, e a mútua repulsão eletrostática expande as cadeias, favorecendo o inchamento.

A formulação com sistemas de entrega de drogas frequentemente utiliza o carbopol para criar géis biocompatíveis, possuindo a capacidade de absorver muitas vezes o seu peso em água e, assim, de produzir géis claros e transparentes que seriam excelentes candidatos a formulações para o tratamento da candidíase vulvovaginal (BHAT et al., 2016; HAMZAVI et al., 2017; MEKA et al., 2017).

## REFERÊNCIAS

ABDUL WAHAB, S. M.; JANTAN, I.; HAQUE, M.; ARSHAD, L. Exploring the leaves of *Annona muricata* L. as a source of potential anti-inflammatory and anticancer agents. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 661, 2018.

ANDERSON, T. M.; CLAY, M. C.; CIOFFI, A. G.; DIAZ, K. A.; HISAO, G. S.; TUTTLE, M. D.; NIEUWKOOP, A.J.; COMELLAS, G.; MARYUM, N.; WANG, S.; UNO, B. E.; WILDEMAN, E. L.; GONEN, T.; RIENSTRA, C.M.; BURKE, M. D. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. **Nature chemical biology**, v. 10, n. 5, p. 400-406, 2014.

ANEJA, B.; IRFAN, M.; KAPIL, C.; JAIRAJPURI, M.A.; MAGUIRE, R.; KAVANAGH, K.; RIZVI, M.M.; MANZOOR, N.; AZAM, A.; ABID, M. Effect of novel triazole-amino acid hybrids on growth and virulence of *Candida* species: 8 and in vivo studies. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 14, n. 45, p. 10599-10619, 2016.

ATRIWAL, T.; AZEEM, K.; HUSAIN, F. M.; HUSSAIN, A.; KHAN, M. N.; ALAJMI, M. F.; ABID, M. Mechanistic understanding of *Candida albicans* biofilm formation and approaches for its inhibition. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 932, 2021.

BHAT, P. A.; CHAT, O. A.; ZHANG, Y.; DAR, A. A. An unprecedented dual responsive gelation of Carbopol induced by Pluronic P123 triblock copolymer. **Polymer**, n. 102, p. 153-166, 2016.

CALDERONE, R.A.; FONZI, W.A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, v.9, n.7, p.327-335, 2001.

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

CARNEIRO, F.M.; SILVA, M.J.P.; BORGES, L.L.; ALBERNAZ, L.C.; COSTA, J.D.P. Técnicas dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais**, v.3, n. 2, p.44-75, 2014.

CASTELLI, M. V.; BUTASSI, E.; MONTEIRO, M. C.; SVETAZ, L. A.; VICENTE, F.; ZACCHINO, S. A. Novel antifungal agents: a patent review (2011-present). **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 24, n. 3, p. 323-338, 2014.

CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M. C. *Candida* biofilms: threats, challenges, and promising strategies. **Frontiers in medicine**, v. 5, p. 28, 2018.

CHANA, W.J.J.; MCLACHLANA, A.J.; HANRAHANA, J.R.; HARNETTA, J.E. The safety and tolerability of *Annona muricata* leaf extract: a systematic review. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 72, n. 1, p. 1-16, 2020.

CHEN, H.; ZHOU, X.; REN, B.; CHENG, L. The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. **Virulence**, v. 11, n. 1, p. 337-348, 2020.

- CORRÊA, N. M.; JÚNIOR, F. B. C.; IGNÁCIO, R. F.; LEONARDI, G. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, pp. 73-78, 2005.
- DENNING, D. W.; BROMLEY, M. J. How to bolster the antifungal pipeline. **Science**, v. 347, n. 6229, p. 1414-1416, 2015.
- EKIERT, H. M.; SZOPA, A. Biological activities of natural products. **Molecules**, v.25, n.23, 5769, 2020.
- FOFANA, S.; KEITA, A.; BALDE, S.; ZIYAEV, R.; ARIPOVA, S. F. Alkaloids from leaves of *Annona muricata*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 48, n. 4, p. 714-714, 2012.
- FOX, E.P.; BUI, C.K.; NETT, J.E.; HARTOONI, N.; MUI, M.C.; ANDES, D.R.; NOBILE, C.J.; JOHNSON, A.D. An expanded regulatory network temporally controls *Candida albicans* biofilm formation. **Molecular Microbiology**, v.96, n.6, p.1226-1239, 2015.
- FROZI, J.B.; ESPER, L.M.R.; FRANCO, R.M. Single- and multispecies biofilms by *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Salmonella* spp. Isolated from raw fish and a fish processing unit. **Ciência Rural**, v.47, n.10, 2017.
- GAVAMUKULYA, Y.; WAMUNYOKOLI, F.; EL-SHEMY, H. A. *Annona muricata*: Is the natural therapy to most disease conditions including cancer growing in our backyard? A systematic review of its research history and future prospects. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 10, n. 9, p. 835-848, 2017.
- GRAZIANO, R.; PREZIOSI, V.; UVA, D.; TOMAIUOLO, G.; MOHEBBI, B.; CLAUSSEN, J.; GUIDO, S. The microstructure of Carbopol in water under static and flow conditions and its effect on the yield stress. **Journal of Colloid and Interface Science**, n. 582, p.1067-1074, 2021.
- GULATI, M.; NOBILE, C.J. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. **Microbes and infection**, v. 18, n. 5, p. 310-321, 2016.
- GUO, D.; YUE, H.; WEI, Y.; HUANG, G. Genetic regulatory mechanisms of *Candida albicans* biofilm formation. **Chinese journal of biotechnology**, v. 33, n. 9, p. 1567-1581, 2017.
- HALL, R.A. Dressed to impress: impact of environmental adaptation on the *Candida albicans* cell wall. **Molecular Microbiology**, v. 97, n.1, p. 7-17, 2015.
- HAMZAVI, N.; DEWAVRIN, J. Y.; DROZDOV, A. D.; BIRGERSSON, E. Nonmonotonic swelling of agarose-carbopol hybrid hydrogel: Experimental and theoretical analysis. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v.55, n.5, p. 444-454, 2017.

HROMATKA, B.S.; NOBLE, S.M.; JOHNSON, A.D. Transcriptional response of *Candida albicans* to nitric oxide and the role of the YHB1 gene in nitrosative stress and virulence. **Molecular Biology of the Cell**, v.16, n.10, p.4814-4826, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Acetogeninas anonáceas. Disponível em: <Definition of Annonaceous acetogenins - NCI Drug Dictionary - National Cancer Institute>. Acesso em: 17 dez. 2021.

JONG, A.Y.; STINS, M.F.; HUANG, S.H.; CHEN, S.H.M.; KIM, K.S. Traversal of *Candida albicans* across human blood-brain barrier in vitro. **Infection and Immunity**, v.69, n.7, p.4536-4544, 2001.

KIM, W. S.; HAN, J. M.; SONG, H. Y.; BYUN, E. H.; LIM, S. T.; BYUN, E. B. *Annona muricata* L.-derived Polysaccharides as a potential adjuvant to a dendritic cell-based vaccine in a Thymoma-bearing model. **Nutrients**, v. 12, n. 6, p. 1602, 2020.

KIM, Y.; KIM, H.; BEUCHAT, L.R.; RYU, J.H. Development of non-pathogenic bacterial biofilms on the surface of stainless steel which are inhibitory to *Salmonella enterica*. **Food microbiology**, v.69, p. 136-142, 2017.

KNIGHT, S.A.B.; VILAIRE, G.; LESUISSE, E.; DANCIS, A. Iron acquisition from transferrin by *Candida albicans* depends on the reductive pathway. **Infection and Immunity**, v.73, n.9, p.5482-5492, 2005.

LEE, Y.; PUUMALA, E.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Antifungal drug resistance: molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond. **Chemical reviews**, n.121, n.6, p. 3390-3411, 2020.

LEBOEUF, M.; CARÉ, A.; TOHAMI, M. E.; PUSSET, J.; FORGACS, P.; PROVOST, J. Alkaloids of Annonaceae. XXXV. alkaloids of *Desmos tiebaghiensis*. **Journal of Natural Products**, v. 45, n. 5, p. 617-623, 1982.

LEITE, D.O.D.; NONATO, C.F.A.; CAMILO, C.J.; CARVALHO, N.K.G.; NÓBREGA, M.G.L.A.; PEREIRA, R.C.; COSTA, J.G.M. *Annona* genus: traditional uses, phytochemistry and biological activities. **Current pharmaceutical design**, v. 26, n. 33, p. 4056-4091, 2020.

LEITE, M. C. A.; BEZERRA, A. P. D. B.; SOUSA, J. P. D.; GUERRA, F. Q. S.; LIMA, E. D. O. Evaluation of antifungal activity and mechanism of action of citral against *Candida albicans*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2014.

MANRIQUE-DE-LA-CUBA, M.F.; GAMERO-BEGAZO, P.; VALENCIA, D.E.; BARAZORDA-CCAHUANA, H.L.; GOMEZ, B. Theoretical study of the antioxidant capacity of the flavonoids present in the *Annona muricata* (Soursop) leaves. **Journal of molecular modeling**, v. 25, n. 7, p. 1-13, 2019.

MÅRDH, P.A.; RODRIGUES, A.G.; GENÇ, M.; NOVIKOVA, N.; MARTINEZ-DEOLIVEIRA, J.; GUASCHINO, S. Facts and myths on recurrent vulvovaginal candidosis - a review on epidemiology, clinical manifestations, diagnosis,

pathogenesis and therapy. **International Journal of STD and AIDS**, v.13, n.8,p.522-539, 2002.

MCCALL, A. D.; PATHIRANA, R. U.; PRABHAKAR, A.; CULLEN, P. J.; EDGERTON, M. *Candida albicans* biofilm development is governed by cooperative attachment and adhesion maintenance proteins. **NPJ biofilms and microbiomes**, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2019.

MEKA, V. S.; SING, M. K.; PICHKA, M. R.; NALI, S. R.; KOLAPALLI, V. R.; KESHARWANI, P. A comprehensive review on polyelectrolyte complexes. **Drug discovery today**, v. 22, n.11, p. 1697-1706, 2017.

MOGHADAMTOUS, S.Z.; FADAEINASAB, M.; NIKZAD, S.; MOHAN, G.; ALI, H.M.; KADIR, H.A. *Annona muricata* (Annonaceae): a review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 7, p. 15625-15658, 2015.

MOYES, D. L.; WILSON, D.; RICHARDSON, J. P.; MOGAVERO, S.; TANG, S. X.; WERNECKE, J.; HÖFS, S.; GRATACAP, R.L.; ROBBINS, J.; RUNGLALL, M.; MURCIANO, C.; BLAGOJEVIC, M.; THAVARAJ, S.; FÖRSTER, T.M.; HEBECKER, B.; KASPER, L.; VIZCAY, G.; IANCU, S.I.; KICHIK, N.; HÄDER, A.; KURZAI, O.; LUO, T.; KRÜGER, T.; KNIEMEYER, O.;COTA, E.; BADER, O.; WHEELER, R.T.; GUTSMANN, T.;HUBE, B.; NAGLIK, J. R. Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. **Nature**, v. 532, n. 7597, p. 64-68, 2016.

MUSHTAQ, S.; ABBASI, B. H.; UZAIR, B.; ABBASI, R. Natural products as reservoirs of novel therapeutic agents. **EXCLI journal**, v. 17, p. 420, 2018.

NETT, J.E.; ANDES, D.R. Antifungal agents spectrum of activity, pharmacology, and clinical indications. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n.1, p. 51-83, 2016.

NOBLE, S.M.; GIANETTI, B.A.; WITCHLEY, J.N. *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 96-108, 2017.

NUGRAHA, A.S.; DAMAYANTI, Y.D.; WANGCHUK, P.; KELLER, P.A. Anti infective and anti-Cancer properties of the *Annona* species: their ethnomedicinal uses, alkaloid diversity, and pharmacological activities. **Molecules**, v. 24, n. 23, p. 4419, 2019.

ODDS FC. Effects of temperature on anti-*Candida* activities of antifungal antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.37, n.4, p.685-691, 1993.

PANWAR, S.L.; PASRIJA, R.; PRASAD, R. Membrane homeostasis and multidrug resistance in yeast. **Bioscience Reports**, v.28, p. 217-228, 2008.

PARENTE-ROCHA, J.A.; BAILÃO, A.M.; AMARAL, A.C.; TABORDA, C.P.; PACCEZ, J.D.; BORGES, C.L.; PEREIRA, M. Antifungal resistance, metabolic routes as drug

targets, and new antifungal agents: an overview about endemic dimorphic fungi. **Mediators of Inflammation**, p-1-16, 2017.

PAPPAS, P.G.; LIONAKIS, M.S.; ARENDRUP, M.C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; KULLBERG, B.J. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v.4, e:18026, 2018.

PARAMYTHIOTOU, E.; FRANTZESKAKI, F.; FLEVARI, A.; ARMAGANIDIS, A. E DIMOPOULOS, G. Invasive fungal infections in the ICU: How to approach, how to treat. **Molecules**, v.19, n.1, p.1085-1119, 2014.

PEREIRA, R.; DOS SANTOS FONTENELLE, R. O.; DE BRITO, E. H. S.; DE MORAIS, S. M. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, n. 1, p. 11-22, 2021.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology and consequences for treatment. **The American Journal of Medicine**, v.125, n.1, p.3-13, 2012.

PINTO, N.C.C.; CAMPOS, L.M.; EVANGELISTA, A.C.S.; LEMOS, A.S.; SILVA, T.P.; MELO, R.C.N.; LOURENÇO, C.C.; SALVADOR, M.J.; APOLÔNIO, A.C.M.; SCIO, E.; FABRI, R.L. Antimicrobial *Annona muricata* L. (sour sop) extract targets the cell membranes of Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Industrial Crops & Products**, v.107, p. 332-340, 2017.

POLESELLO, V.; SEGAT, L.; CROVELLA, S.; ZUPIN, L. *Candida* infections and human defensins. **Protein and peptide letters**, v. 24, n. 8, p. 747-756, 2017.

POLKE, M.; HUBE, B.; JACOBSEN, I. D. *Candida* survival strategies. **Advances in applied microbiology**, v.91, p.139-235, 2015.

PRASAD, R.; RAWAL, M. K. Efflux pump proteins in antifungal resistance. **Frontiers in pharmacology**, v. 5, n.202, p.1-13, 2014.

RADY, I.; BLOCH, M.B.; CHAMCHEU, R.C.N.; MBEUMI, S.B.; ANWAR, M.R.; MOHAMED, H.; ABIOLA S. BABATUNDE, A.S.; JULES-ROGER KUIATE, J.R.; NOUBISSI, F.K.; EL SAYED, K.A.; WHITFIELD, G.K.; CHAMCHEU, J.C. Anticancer properties of graviola (*Annona muricata*): a comprehensive mechanistic review. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, 2018.

RIBEIRO, F. C.; ROSSONI, R. D.; DE BARROS, P. P.; SANTOS, J. D.; FUGISAKI, L. R. O.; LEÃO, M. P. V.; JUNQUEIRA, J. C. Action mechanisms of probiotics on *Candida* spp. and candidiasis prevention: an update. **Journal of applied microbiology**, v. 129, n. 2, p. 175-185, 2020.

RODRIGUES, C. F.; RODRIGUES, M. E.; HENRIQUES, M. *Candida* sp. infections in patients with diabetes *mellitus*. **Journal of clinical medicine**, v. 8, n. 1, p. 76, 2019.



RODRIGUEZ, L.; BUSTAMANTE, B.; HUAROTO, L.; AGURTO, C.; ILLESCAS, R.; RAMIREZ, R.; DIAZ, A.; HIDALGO, J. A multi-centric study of *Candida* bloodstream infection in Lima-Callao, Peru: Species distribution, antifungal resistance and clinical outcomes. **PLoS One**, v. 12, n. 4, p. e0175172, 2017.

RODRÍGUEZ-CERDEIRA, C.; MARTÍNEZ-HERRERA, E.; CARNERO-GREGORIO, M.; LÓPEZ-BARCENAS, A.; FABBROCINI, G.; FIDA, M.; EL - SAMAHY, M.; GONZÁLEZ-CESPÓN, J. L. Pathogenesis and clinical relevance of *Candida* biofilms in vulvovaginal candidiasis. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 2884, 2020.

RUDNICKA, L.; OLSZEWSKA, M.; GOLDUST, M.; WAŚKIEL-BURNAT, A.; WARSZAWIK-HENDZEL, O.; DOROŻYŃSKI, P.; RAKOWSKA, A. Efficacy and safety of different formulations of Calcipotriol/Betamethasone Dipropionate in psoriasis: Gel, Foam, and Ointment. **Journal of Clinical Medicine**, v.10, n.23, 5589, 2021.

SALCI, T. P.; NEGRI, M.; ABADIO, A. K. R.; SVIDZINSKI, T. I. E.; KIOSHIMA, É. S. Targeting *Candida* spp. to develop antifungal agents. **Drug discovery today**, v.23, n.4, p.802-814, 2018.

SARDI, J. C. O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; MENDES GIANNINI, M. J. S. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p.10-24, 2013.

SOLL, D.R.; DANIELS, K. J. Plasticity of *Candida albicans* biofilms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 3, p. 565-595, 2016.

SOLL, D.R.; LOCKHART, S.R.; ZHAO, R. Mating and virulence of *Candida albicans*. **Mycologist**, v.17, n.2, p.64-69, 2003.

SPAMPINATO, C., LEONARDI, D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. **BioMed research international**, 2013.

SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Cyclodextrins as food ingredients. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, p. 137-142, 2004.

TALAPKO, J.; JUZBAŠIĆ, M.; MATIJEVIĆ, T.; PUSTIJANAC, E.; BEKIĆ, S.; KOTRIS, I.; ŠKRLEC, I. *Candida albicans* - The virulence factors and clinical manifestations of infection. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 79, 2021.

TALAPKO, J.; ŠKRLEC, I. The principles, mechanisms, and benefits of unconventional agents in the treatment of biofilm infection. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 10, p. 299, 2020.

THAKUR, L.; GHODASRA, U.; PATEL, N.; DABHI, M. Novel approaches for stability improvement in natural medicines. **Pharmacognosy Review**, v. 5, n. 9, p. 48-54, 2011.

THAPA, R. K.; DIEP, D. B.; TØNNESEN, H. H. Topical antimicrobial peptide formulations for wound healing: Current developments and future prospects. **Acta biomaterialia**, v.103, p. 52-67, 202,

VALLE AL. Current methodologies in assessing the toxicity of natural products. **International Journal Phytocosmetics and Natural Ingredients**, v. 5, n. 3, 2018.

VALLI, M.; RUSSO, H.M.; BOLZANI, V.S. The potential contribution of the natural products from Braziliam biodiversity to bioeconomy. **Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, p. 763-778, 2018.

VAN DAELE, R.; SPRIET, I.; WAUTERS, J.; MAERTENS, J.; MERCIER, T.; VAN HECKE, S.; BRÜGGEMANN, R. Antifungal drugs: what brings the future?. **Medical mycology**, v. 57, n. 3, p. 328-S343, 2019.

WALL, G.; MONTELONGO-JAUREGUI, D.; BONIFACIO, B. V.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; UPPULURI, P. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. **Current opinion in microbiology**, v. 52, p. 1-6, 2019.

WIBAWA, T. The role of virulence factors in *Candida albicans* pathogenicity. **Journal of medical science**, v. 48, n. 1, p. 58-68, 2016.

WILLEMS, H. M.; AHMED, S. S.; LIU, J.; XU, Z.; PETERS, B. M. Vulvovaginal candidiasis: a current understanding and burning questions. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 27, 2020.

WU, F. E.; GU, Z. M.; ZENG, L.; ZHAO, G. X.; ZHANG, Y.; MCLAUGHLIN, J. L. Two new cytotoxic monotetrahydrofuran Annonaceous acetogenins, annomuricins A and B, from the leaves of *Annona muricata*. **Journal of natural products**, v. 58, n. 6, p. 830-836, 1995a.

WU, F. E.; ZENG, L.; GU, Z. M.; ZHAO, G. X.; ZHANG, Y.; SCHWEDLER, J. T. Muricatocins A and B, two new bioactive monotetrahydrofuran Annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona muricata*. **Journal of natural products**, v. 58, n. 6, p. 902-908, 1995b.

WU, F. E.; ZHAO, G. X.; ZENG, L.; ZHANG, Y.; SCHWEDLER, J. T.; MCLAUGHLIN, J. L. Additional bioactive acetogenins, annomutacin and (2, 4-trans and cis)-10R-annonacin-A-ones, from the leaves of *Annona muricata*. **Journal of natural products**, v. 58, n. 9, p. 1430-1437, 1995c.

YAN, L.; WANG, X.; SEYEDMOUSAVI, S.; YUAN, J.; ABULIZE, P.; PAN, W.; DENG, S. Antifungal susceptibility profile of *Candida albicans* isolated from vulvovaginal candidiasis in Xinjiang province of China. **Mycopathologia**. 2018.

YANG, C.; GUNDALA, S. R.; MUKKAVILLI, R.; VANGALA, S.; REID, M. D.; ANEJA, R. Synergistic interactions among flavonoids and acetogenins in *Graviola (Annona muricata)* leaves confer protection against prostate cancer. **Carcinogenesis**, v. 36, n. 6, p. 656-665, 2015.

YANO, J.; PETERS, B.M.; NOVERR, M.C.; FIDEL JUNIOR, P.L. Novel Mechanism behind the immunopathogenesis of vulvovaginal candidiasis: "Neutrophil anergy". **Infection and Immunity**, v. 86, n.3, p.1-12, 2018.

YANO, J.; SOBEL, J.D.; NYIRJESY, P.; SOBEL, R.; WILLIAMS, V.L.; YU, Q.; NOVERR, M.C.; FIDEL, P.L. Current patient perspectives of vulvovaginal candidiasis: incidence, symptoms, management and post-treatment outcomes. **BMC Womens Health**. v.19, n.1, 48p, 2019.

YU, J.; GUI, H.; LUO, X.; SUN, L.; ZHU, P.; YU, Z. Studies on the chemical constituents of *Annona muricata*. **Acta pharmaceutica Sinica**, v. 32, n. 6, p. 431-437, 1997.

ZENG, L.; YE, Q.; OBERLIES, N. H.; SHI, G.; GU, Z. M.; HE, K.; MCLAUGHLIN, J. L. Recent advances in annonaceous acetogenins. **Natural Product Reports**, v. 13, n. 4, p. 275-306, 1996.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antifúngica do extrato etanólico das folhas de *Annona muricata* L. (AME) na sua forma livre e incorporado a uma formulação a base de carbopol, visando o tratamento de infecções fúngicas causadas por *Candida albicans*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as substâncias presentes em AME por meio de *UFLC-QTOF-MS*;
- Determinar a Concentração inibitória mínima (CIM) e a Concentração fungicida mínima (CFM) de AME frente uma linhagem padronizada de *C. albicans*;
- Avaliar o efeito de AME sobre a curva de crescimento microbiano e densidade celular de uma linhagem padronizada de *C. albicans*;
- Elucidar o mecanismo de ação de AME frente uma linhagem padronizada de *C. albicans* em ensaios destinados ao envoltório celular, atividade metabólica e potencial de membrana mitocondrial;
- Avaliar a atividade *in vitro* de AME nas fases de adesão e proliferação de biofilmes pré-formados por uma linhagem padronizada de *C. albicans*;
- Investigar a ação de AME sobre a matriz polimérica de biofilmes pré-formados por uma linhagem padronizada de *C. albicans*;
- Desenvolver de formulações a base de carpobol contendo diferentes concentrações de AME;
- Realizar a caracterização reológica das formulações a base de carpobol contendo diferentes concentrações de AME;
- Avaliar a atividade antifúngica *in vivo* em modelo animal de candidíase vulvovaginal, utilizado AME na sua forma livre e incorporado a uma formulação a base de carbopol.

#### 4 DIVISÃO DOS CAPÍTULOS

Para melhor compreensão este trabalho foi dividido em três capítulos apresentados na forma de dois artigos científicos e uma patente. O primeiro artigo já publicado na revista *Journal of Ethnopharmacology* (DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115856>) e o segundo, a ser submetido para a mesma revista. A patente foi enviada para o Centro Regional de Inovação e Transferência de Tecnologia (CRITT) para registro de depósito.

**5 CAPÍTULO 1 – ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO ETANÓLICO DE *A. muricata* CONTRA *C. albicans* MULTIRRESISTENTE: AÇÃO EM ENVOLTÓRIO CELULAR DE CÉLULAS PLANCTÔNICAS FÚNGICAS (ANEXO I).**

**ARTIGO 1**

**Antifungal *Annona muricata* L. (sour sop) extract targets the cell envelope of multi-drug resistant *Candida albicans***

**Publicado na revista “Journal of Ethnopharmacology”**

## **Antifungal *Annona muricata* L. (sour sop) extract targets the cell envelope of multi-drug resistant *Candida albicans***

Lara M. Campos<sup>a</sup>; Ari S. O. Lemos<sup>a</sup>; Irley O. M. Diniz<sup>a</sup>; Lucas A. Carvalho<sup>a</sup>; Thiago P. Silva<sup>b</sup>; Paula R. B. Dib<sup>c</sup>; Eugênio D. Hottz<sup>c</sup>; Luciana M. Chedier<sup>d</sup>; Rossana C. N. Melo<sup>b</sup>; Rodrigo L. Fabri<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Bioactive Natural Products Laboratory, Department of Biochemistry, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Cellular Biology, Department of Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil

<sup>c</sup> Laboratory of Immunothrombosis, Department of Biochemistry, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil

<sup>d</sup> Plant Chemistry Laboratory, Department of Botany, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil

### **Abstract**

*Ethnopharmacological relevance:* *Annona muricata* L. (sour sop) is traditionally used in the treatment of inflammatory diseases, cancer, and infections caused by fungi. The therapeutic activity explored by its medicinal use is generally associated with its phytoconstituents, such as acetogenins and alkaloids. However, its potential antifungal bioactivity as well as its mechanism of action remains to be established.

*Aim of the study:* To evaluate the antifungal activity of the ethanolic extract of *A. muricata* leaves against multidrug-resistant *Candida albicans* (ATCC® 10231).

*Material and methods:* Phytoconstituents were detected by *UFLC-QTOF-MS*. The minimum inhibitory concentration was determined, followed by the determination of the minimum fungicidal concentration. For planktonic cells, the growth curve and cell density were evaluated. Studies to understand the mechanism of action on the cell envelope involved crystal violet permeability, membrane extravasation, sorbitol protection, exogenous ergosterol binding assay, metabolic activity, and cell viability. Furthermore, mitochondrial membrane potential was assessed.

*Results:* Our analyses demonstrated a significant inhibitory effect of *A. muricata*, with the ability to reduce fungal growth by 58% and cell density by 65%. The extract affected

both the fungal plasma membrane and cell wall integrity, with significant reduction of the cell viability. Depolarization of the fungal mitochondrial membrane was observed after treatment with *A. muricata*. Rutin, xi-anomuricine, kaempferol-3O-rutinoside, nornuciferine, xylopin, atherosperminine, caffeic acid, asimilobine, s-norcorydine, loliolide, annohexocin, annomuricin, annopentocin, and sucrose were identified as extract bioactive components.

*Conclusions:* Our findings show that the *A. muricata* extract is a source of chemical diversity, which acts as a potential antifungal agent with promising application to the therapy of infections caused by *C. albicans*.

*Keywords:* Antifungal activity; *Annona muricata*; *Candida albicans*; chemical diversity; fungal cells; cell viability

## 1. Introduction

*Candida albicans* is a microorganism of clinical importance in invasive human diseases and generates high healthcare costs worldwide. These infections are considered emerging, especially in the immunocompromised population (Chen et al., 2020). However, current therapeutic choices for the treatment of invasive fungal infections are limited and are associated with high toxicity (Van Daele et al., 2019).

The restricted number of antifungal drugs available challenges the treatment of invasive pathologies. Currently, only four different classes of these drugs are used to treat numerous fungus-associated diseases: polyenes, azoles, nucleoside analogues, and echinocandins (Gintjee et al., 2020). Fungal pathogens are increasing their multidrug resistance properties and evolving virulence factors, which is particularly problematic in clinical settings (Jamiu et al., 2021). Alternative therapies such as natural products have been studied and directed towards understanding mechanisms of action, epidemiology, antifungal resistance, and pathogenesis. Such models have become relevant due to the high incidence of fungal infections caused by *Candida* species and their increasing resistance to conventional treatments (Newman et al., 2017).

*Annona muricata* L. is a tropical plant fruit species that belongs to the *Annonaceae* family and is commonly known as soursop. In India and tropical America and Africa, *A. muricata* is extensively used as an ethnomedicine against a variety of human



ailments and diseases, especially cancer, diabetes, rheumatism and parasitic infections (Moghadamtousi et al, 2015,), in addition to other uses (Moghadamtousi et al, 2015, Quílez et al., 2018, Coria-Téllez et al., 2018; Gavamukulya et al., 2017). Extracts and phytoconstituents of *A. muricata* are considered to have multiple beneficial effects with potential antimicrobial, anti-inflammatory, anti-protozoal, antioxidant, insecticidal, and larvicidal activities (Coria-Téllez et al., 2018; Gavamukulya et al., 2017; Kim et al., 2020; Quílez et al., 2018). These activities are associated with compounds found in fruits and leaves, mainly acetogenins, phenolic compounds, alkaloids, and terpenes (Leite et al., 2020). Cytotoxic effects for tumor cells, hepatoprotective and hypoglycemic activities also are reported for *A. muricata* natural compounds (Mishra et al., 2013; Adewole et al., 2009, Kim et al., 2020).

Few previous studies have shown the fungicidal property activity of extracts and fractions of *A. muricata* against *Candida* species, including *C. albicans* strains, *in vitro* (Pai et al., 2016; Cesar et al, 2021). However, the mechanism of action of *A. muricata* extracts against *C. albicans*, especially multidrug-resistant strains, remains to be established. Here, we investigate the antifungal activity and mechanisms of action of ethanolic extract of *A. muricata* (AME) against a multidrug-resistant *C. albicans* strain.

## **2. Material and methods**

### *2.1 Plant material*

The leaves of *A. muricata* L. were collected in March 2018, in the city of Recreio, Minas Gerais, Brazil, at the following coordinates 19°52' 30,8'' S; 43°58' 31,7'' with license number A032F41-23 SISGEN/BRAZIL. Dr. Vinícius Antônio de Oliveira Dittrich, from the Botany Department of the Federal University of Juiz de Fora (UFJF), made the identification of the plant. Voucher specimens (CESJ 46006) of the plant parts were deposited in the Leopoldo Krieger Herbarium at UFJF.

### *2.2 Preparation of the extract*

The leaves from *A. muricata* L. were dried in an oven with forced air circulation at 40°C and pulverized to obtain a dry plant material (6.5g). A static maceration was performed with ethanol as a liquid phase, at room temperature to extract the material.

The extract was concentrated by reduced pressure evaporation, obtaining the ethanolic extract of *A. muricata* (AME) 6.6% yield.

### 2.3 Ultra-fast liquid chromatography-Quadrupole time of flight mass spectrometry (UFLC-QTOF-MS) analysis

AME (5 mg) was analyzed by ultra-fast liquid chromatography coupled with mass spectrometry in the positive ion mode using a Shimadzu UFLC (Nexera model) and a Bruker mass spectrometer (QTOF Compact model) with an electrospray ionization source. The mobile phase employed was water acidified with formic acid, pH = 3 (phase A), and methanol (phase B), the injection flow rate was 0.4 mL/minute with a running time of 12 minutes. The column used was a Kinetex 2.6  $\mu\text{m}$ , C18-100A, 100 mm x 3.0 mm. The chromatographic run began with 40% of phase B, increasing to 70% of B at 8.20 minutes and 95% of B at 9.70 minutes. Subsequently, the mobile phase was returned to 40% B at 10.20 minutes, to re-equilibrate the column, following up to 11.50 minutes, the running ended in 12 minutes. The ionization conditions were set as follows: electrospray voltage of the ion source 40 V, a capillary voltage 4500 V, and a capillary temperature of 220 °C. The full scan mass acquisition was performed by scanning from 100 up to 1000 m/z range.

### 2.4 Fungal strain

The studies were performed using the *C. albicans* species (ATCC 10231), characterized for having resistance to itraconazole, voriconazole, anidulafungin and fluconazole (ATCC, 2017). Professor Marcelo Gonzaga de Freitas Araújo from the Universidade Federal de São João del Rey, *campus* Centro Oeste Dona Lindu, kindly provided this microorganism for the study. The strain was cultured overnight at 35 °C in RPMI-1640 culture media before each experiment. All experiments and following analyzes were done in triplicates.

### 2.5 Minimum inhibitory concentration (MIC)

MIC was determined by assay using the protocol described by CLSI (CLSI modified, 2017). The tests were performed using RPMI 1640 media. Yeasts were grown overnight at 35°C on Sabouraud Dextrose Agar (SDA). In 96-well microplates, successive microdilutions of 1000 to 7.8  $\mu\text{g/mL}$  were performed. For this preparation,

stock solutions of 2.5 mg/mL in Dimethyl sulfoxide (DMSO) 1% were used. In microplates that already contained 100  $\mu$ L of RPMI 1640, 80  $\mu$ L of this stock solution was added. The final volume of 200  $\mu$ L was completed by adding 20  $\mu$ L of inoculum ( $3 \times 10^5$  CFU/mL), based on the standard 1.0 McFarland scale. The plates were incubated at 35°C for 24 hours. A growth control (RPMI 1640 + extract) were simultaneously performed. Nystatin (10 to 0.16  $\mu$ g/mL), fluconazole (10,000 to 39  $\mu$ g/ml), and itraconazole (400 to 3.2  $\mu$ g/mL) were used as positive controls. DMSO solvent control was also performed. The MIC was calculated by the lowest dilution that shows a complete inhibition of the strain on which the tests were performed. All tests were performed in duplicate.

### 2.6 Minimum fungicidal concentration (MFC)

Aliquots of 10  $\mu$ L were taken from the plate samples in the wells without visible growth in the MIC assay. The removed aliquots were streaked onto ASD plates, which were then incubated at 35°C for a period of 24 hours. All tests were done in triplicate. The MFC is reported as the lowest concentration of the extract capable of causing yeast death (Lemos et al., 2020).

### 2.7 Fungal killing assay

AME was tested to determine the growth curve for *C. albicans*. Freshly grown fungal strains were inoculated into tubes containing RPMI 1640 media supplemented with AME at 35°C. Absorbance was measured at 560 nm at 0, 4, 8, 12, 24, 30, 36, 48, 60 and 72 hours. Graphs of turbidity versus incubation time were plotted. Growth rate curves were studied to evaluate signs of fungicidal effect of AME. Nystatin was used as positive control. Fungal strains inoculated in RPMI 1640 served as the growth control. The procedure was performed in triplicate (Lemos et al., 2020).

### 2.8 Fungal cell density

Fungal counts were performed in cytocentrifugation separation based on Silva et al. (2014), using a marker that binds to DNA double strand and emits a blue fluorescence, called 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Joux and Lebaron, 2000). Strains of *C. albicans* were inoculated in RPMI 1640 media tubes containing AME (MIC value), then incubated at 35°C for 24 hours. The microorganisms that were inoculated in RPMI 1640 were used as growth control and the positive controls were incubated

with nystatin (MIC value). Samples were stained with DAPI at a final concentration of 5 µg/mL, fixed with 4% formaldehyde and prepared in a cytocentrifuge (Shandon cytospin 4, Thermo Electron) at 452g for 10 minutes at high acceleration. A fluorescence microscope (Olympus BX-60) was used to count the yeast cells on the slides in 10 random fields at 1000x magnification using immersion oil. For fungal quantification the following formula was used:  $(nxa)/(Vxa)$ , in which n= number of cells counted, a= area of the grid counted, and V= sample volume x volume counted/total volume. Analyzes were performed in triplicates.

## 2.9 Cell envelope studies

### 2.9.1 Measurement of permeability with crystal violet

Crystal violet (CV) assay was performed as described by Campos et al. (2018) for the evaluation of membrane permeability changes. Thereafter, freshly grown fungal lines in RPMI 1640 media were inoculated into tubes supplemented with AME and nystatin (MIC value) at 35°C temperature, then incubated for 4 hours. The fungal cell suspensions were centrifuged at 1000g /10 minutes and the pellet was resuspended in 10 µg/mL crystal violet solution and subsequently incubated for 10 minutes at 35°C. A spectrophotometer (Multiskan Go, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) with a wavelength of 570 nm was used to measure the optical density (OD) of the supernatant obtained from the centrifugation of the samples (1000g/15 minutes). For the growth control, the OD of the supernatant of the normal group of untreated cells was used. The OD value of the crystal violet solution was taken as 100%. Analyzes were performed in triplicates. The following formula was used to express the percentage of crystal violet uptake:  $(\text{OD value of the sample} / \text{OD value of the CV solution}) \times 100 = \text{percentage violet crystal uptake}$ .

### 2.9.2 Nucleotide leakage

The methodology was performed according to Campos et al. (2018). *C. albicans* was incubated in RPMI 1640 media at 35 °C for 24 hours. Subsequently, the culture was centrifuged at 1000 rpm for 5 minutes, washed and resuspended in 10 mM Phosphate-buffered saline (PBS) solution (pH 7.4), reaching a final density of  $3 \times 10^6$  CFU/mL. The microorganisms were incubated with AME and nystatin (MIC value) at different times (0, 1, 2, 3, and 4 hours). As a control, we used cells incubated with 10

mM PBS (pH 7.4). Supernatants obtained from the suspensions were centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes and analyzed at 260 nm. Only at 4 hours, total proteins were quantified by the Lowry method (1951). The procedures were performed in triplicate.

#### *2.9.3 Ergosterol effect assay*

The MIC of AME was determined according to the methodology of Khan et al. (2013) and Leite et al. (2014). In a 96-well microplate, containing ergosterol-enriched RPMI 1640 media (400 µg/mL), serial microdilution was performed. A dilution of the AME stock solution was performed at concentrations ranging from 16.000 to 25 µg/mL. For the positive control, nystatin (100 to 0.78 µg/mL) was used. After 24 hours of incubation at 35°C, the MIC values were determined. All tests were performed in duplicate.

#### *2.9.4 Sorbitol protection assay*

To evaluate the osmoprotection of sorbitol, a model described by Frost et al. (1995) and Khan et al. (2013). In a sterile 96-well microplate containing RPMI 1640 media enriched with 0.8 M sorbitol, serial microdilution was performed. The stock solution of AME was diluted at concentrations ranging from 16000 to 125 µg/mL. The determination of the MIC values was done after incubation for 24 hours at 35°C. All tests were performed in duplicate.

#### *2.9.5 Cell viability*

Plasma membrane integrity was assessed by the method described by Lee et al. (2015). The fungal cell suspension ( $3 \times 10^6$  CFU/mL) was treated with AME or nystatin, with a final concentration equivalent to MIC, for 4 hours and incubated at 35 °C. The treatments were performed in triplicate. Cells were washed with Hank's Buffered Salf Solution HBSS (1500 rpm for 5 minutes) and incubated with 1.25 µg/mL of propidium iodide (PI). The incubation time was 30 minutes. The effect of treatments on the cell envelope was evaluated using the FACSCanto II flow cytometer with the acquisition of 10,000 events. In the analysis of the data through the software FlowJo®, the percentage of positive cells for the IP was determined.

### 2.9.6 Cellular metabolic activity

Yeast viability was assessed by intracellular metabolic activity by the LIVE/DEAD Yeast Viability kit (Molecular Probes), which consists of two fluorescent markers, FUN-1 and Calcofluor White (CW). *C. albicans* strain was inoculated into RPMI 1640 media tubes containing AME (MIC value) and incubated for 24 hours at 35°C. For growth and positive controls, fungi were inoculated in RPMI 1640 or nystatin (MIC value), respectively. All the treatments were performed in triplicate. Yeast suspensions (1 mL of each sample, n = 3) were stained with 1 µL of FUN 1 and 5 µL of CW. After incubation at 35°C for 30 minutes in the dark, slide samples were prepared by cytocentrifugation (Shandoncytospin 4, ThermoElectron) at 452g for 10 minutes (SILVA et al. 2014). The resulting slides were analyzed by fluorescence microscopy (BX-60, Olympus) and yeast cell counts were done by using both the U-MWU2 fluorescent filter (CW) and the U-MWB filter (FUN-1). The proportion of viable active/non-viable inactive yeasts were determined by differential cell counting in 10 random fields.

### 2.9.7 Mitochondrial membrane potential (MMP)

MMP was determined using tetramethylrhodamine (TMRE), a probe used to label active mitochondria (Tian et al., 2017). The fungal cell suspension ( $3 \times 10^6$  CFU/mL) was treated with AME or nystatin (both with concentrations relative to the MIC value) for 4 hours. To control the experiment, the standards carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone - FCCP (10 µM) and oligomycin A (15 µg/mL) were used in cultures for 10 minutes before incubation with TMRE. Cultures incubated with buffer alone were used as treated and untreated growth controls. After exposure, cells were centrifuged at 1500 rpm for 5 minutes, washed with HBSS buffer and incubated with 20 µM TMRE at 35 °C for 30 minutes. After labeling, the material was again centrifuged and resuspended in HBSS buffer. The average fluorescence intensity (MFI) of the suspensions were quantitatively analyzed in a FACSCanto II flow cytometer (Becton & Dickinson) with 10,000 acquired events. The assays were carried out in triplicate and the FlowJo® program was used for the analyses.

### 2.10 Statistical analysis

The statistical analysis used to compare the positive control and treated groups (AME and nystatin) was performed by ANOVA followed by the Bonferroni test

( $P < 0.05$ ), using Prism 6.0.1 software (GraphPad software, San Diego, CA, United States).

### 3. Results

#### 3.1 Chemical analysis of AME by UFLC-QTOF-MS

The chromatographic profile obtained by UFLC-QTOF-MS was acquired and 14 compounds were identified as described in Table 1.

#### 3.2 Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC)

The minimum inhibitory concentration (MIC) value for AME was 1,000  $\mu\text{g/mL}$ . In this concentration, AME showed fungistatic effect against *C. albicans*. The MIC values obtained for fluconazole, itraconazole, and nystatin were 10000, 200, and 2.5  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. These results evidenced a resistance by *C. albicans* for fluconazole and itraconazole, and sensitivity for nystatin.

#### 3.3 Fungal killing assay

The fungal growth kinetics of *C. albicans* was acquired through optical density (600 nm) for 72 h (Fig. 1A). Analyses of area under the curve showed a significant reduction of fungal growth in AME and nystatin treatments in comparison with growth control along 72 h ( $P < 0.05$ ; Fig. 1B). Fungi treated with AME reduced their growth around 58% when compared to the growth control (Fig. 1B). Indeed, both treatments, AME and nystatin, extended the lag phase (between 4 and 12h) and induced a decrease in the growth cycle curve (in log phase) when compared to the growth control (Fig. 1A).

#### 3.4 Fungal cell density

Using fluorescence microscopy, we investigated the effect of AME on cell density (Fig. 1C). Quantitative analyses showed that yeast cell density was significantly reduced in 65% and 63% for AME and nystatin treatments, respectively ( $P < 0.05$ ).

### 3.5 Measurement of permeability with crystal violet

Our data indicate a growth in fungal cell permeability evidenced by the increase in CV uptake (Fig. 2A). After treatment with AME the CV uptake increased in 3.6-fold when compared to the growth control ( $P < 0.05$ ).

### 3.6 Nucleotide leakage

The effect on cell permeability can be evaluated by measuring the release of an intracellular component (nucleotides) into the medium from cells washed in buffer. The release of nucleotides from *C. albicans* was highest when these cells were treated with AME and nystatin already in the first hours of treatment (Fig. 2B). Upon treatment with AME, a 6-fold increase was obtained when compared to control ( $P < 0.05$ ). Analyses of area under the curve showed a significant an increased extravasation of extracellular fungal components in AME and nystatin treatments in comparison with growth control along 4 h ( $P < 0.05$ ; Fig. 2C). At the end of the 4 hours of treatment with AME and nystatin, we can also observe a greater release of proteins, indicating extravasation to the extracellular medium (Table 2).

### 3.7 Ergosterol and sorbitol protection assays

These assays evaluated the ability of AME to disrupt the fungal cell wall and membrane, which form the cell envelope. An increase in the MIC value was observed in both assays (Table 3), indicating that AME has a possible activity on the structures that make up the cell envelope.

### 3.8 Cell viability

The ability to damage the cell envelope was assessed by PI after treatment with AME. A change in cell profile was clearly observed when compared to control, when analyzing the parameters of size and granularity (Fig. 3A and 3B). The fluorescence intensity was mainly increased when *C. albicans* was treated with AME. Fig. 3C shows a change in fluorescence intensity in the histograms after treatment of the fungal cells with AME. 38% and 14.5% of the cells were damaged and internalized PI for AME and nystatin, respectively (Fig. 3D) ( $P < 0.05$ ). AME significantly increased the amount of unviable fungal cells when compared to control and nystatin treated group (Fig. 3E) ( $P < 0.05$ ).



### 3.9 Cellular metabolic activity

Metabolic activity analyses was performed using the LIVE/DEAD Yeast Viability kit®. By CW staining visualization by fluorescence microscopy (Fig. 4A) we noticed that AME and nystatin significantly reduced the number of yeast cells with intact cell wall when compared to control (23% and 45%, respectively) (Fig. 4B) ( $P < 0.05$ ). After Fun-1 staining yeast cells with a full metabolic activity were seen as bright green cells with CIVS stained in red (Fig. 4C and 4Ci, arrowheads). Quantitative analyses under a fluorescence microscope showed that treatment with nystatin and AME led to a significant reduction of the metabolic activity of yeast cells (Fig. 4D).

### 3.10 Mitochondrial membrane potential (MMP)

TMRE allows the labeling of active mitochondria. AME treatment alters the fungal cell dispersion profile when compared to control (Fig. 5A and 5B) Cytometer analyses of the cells provide different fluorescence intensity data, which treatment with the extract was able to decrease this intensity compared to the control (Fig. 5C). Both AME and nystatin caused a depolarization in the mitochondrial membrane, leading to inactivation of mitochondria, where AME and nystatin significantly reduced by 79% and 81% the fluorescence intensity when compared to control (Fig. 5D) ( $P < 0.05$ ).

## 4. Discussion

There are several mechanisms that lead *C. albicans* to "escape" the action of conventional antifungal drugs, such as overexpression of efflux pumps and alteration of the cell membrane and biofilm formation, which are the most dominant resistance strategies (Hans et al., 2019). Thus, the focus of this work was to study possible mechanisms of action of the ethanolic extract from *A. muricata* leaves (AME), targeting the treatment for infections caused by this species and the possibility of reducing these virulence factors.

Initially, the antifungal activity was evaluated by determining the MIC, which corresponds to the lowest effective concentration of the sample that inhibits visible fungal growth after an incubation period. The minimum fungicidal concentration corresponds to that concentration capable of preventing the growth of a microorganism in subcultures free of antimicrobial substances, which predicts the death and fungicidal

action of the sample (Belanger and Hancock, 2021). Our results showed that AME has promising antifungal activity with fungistatic effect at MIC value.

We analyzed the behavior of *C. albicans* in the presence of AME and nystatin on MIC values. Monitoring fungal growth and death on the action of compounds are often used to understand antimicrobial action over time (Foerster et al., 2016). As nystatin, AME showed a potential to delay the adaptation phase by interfering with the initiation of cell division, repairing some molecular damage, or changing the synthesis of cellular components necessary for its normal growth (Freire et al., 2017; Lemos et al., 2018; Toledo et al., 2020). In the log phase, characterized by accentuated growth and high metabolic activity, a decrease in this stage was detected as a response to the extract treatment, indicating an interference with cell integrity, unlike nystatin, which maintained growth (Campos et al., 2018). A reduction in cell density was clearly associated with the decrease in the growth curve of *C. albicans* after treatment with AME (Fig. 1C).

AME was effective in injuring the fungal cell envelope (Fig. 2). The increase in membrane permeability was observed when there was a greater uptake of crystal violet after incubation with AME, which was superior to the treatment with nystatin. Hydrophobic crystal violet exhibits low penetration in normal cells, however, in cells with damage to the cell envelope there is accumulation. Therefore, cellular uptake of crystal violet is easily increased when the envelope is defective, but is not detected when intact (Baena-Santillán et al., 2020). The leakage of cytoplasmic materials indicates damage to the fungal cell envelope (Lee and Kim, 2015; Zorić et al., 2017), being confirmed and superior when compared to nystatin after treatment with AME. In addition to the nucleotide permeability, protein release into the extracellular environment can also serve as a marker of membrane damage (Niu et al., 2020), as demonstrated in the AME-treated groups.

Other results have also shown that AME has activity on the fungal cell envelope (cell wall and plasma membrane). The use of antifungal agents can cause damage to the fungal cell wall, but in the presence of osmoprotectants, such as sorbitol, this damage is minimized (Essid et al., 2017). Substances with an antifungal effect act on essential components of the cell or fungal wall and cause cell lysis in the absence of osmoprotectant. However, if a stabilizer is present in the medium, the cells will continue to grow (Frost et al., 1995). When sorbitol is used, there is an increase in the MIC value, revealing the action of AME in targeting this substance, which is relevant for cell

wall synthesis. Some antifungals exhibit membrane-damaging effects by targeting ergosterol, which is a structural lipid essential for many aspects of cell physiology. Damage to this structure can form transmembrane pores that lead to a change in membrane permeability and consequent disruption (Lone et al., 2020). Antifungals, as nystatin, whose action target is binding to membrane ergosterol suffer a shift in their activity when there is a culture medium containing exogenous ergosterol, providing an impediment to binding to membrane ergosterol (Pippi et al., 2019). An increase in the MIC value of AME was observed in the presence of exogenous ergosterol, thus suggesting the ability of compounds present in AME to bind to fungal ergosterol.

Membrane integrity analysis was evaluated by flow cytometry using propidium iodide (PI), a reagent that binds to double-stranded DNA, which is not internalized in cells with intact plasma membranes. Therefore, fungal cells with damaged membranes are able to internalize PI (Bouarab et al., 2021). A significant increase in cell damage was detected in cells treated with AME, in accord with other tests performed for the cell envelope, which indicated a more effective action of the extract compared to nystatin. This effect is related to damage to the fungal cell wall, as well as the plasma membrane, which would explain the greater internalization of PI.

In order to confirm the effect of AME on the cell envelope, the metabolic activity assay was performed using specific markers.. FUN-1 labels the cytoplasm of all yeasts in yellow-green. In cells with an intact plasma membrane and normal metabolic function, FUN-1 fluorescence is converted and marks intracellular vacuoles in orange-red. Calcofluor White M2R detects the chitin of the cell wall with blue fluorescence, regardless of the metabolic state (Campos et al., 2021; Ingham et al., 2012).

Core mitochondrial functionality is the ability to pump protons across the inner membrane to create a gradient with high potential energy, the mitochondrial membrane potential (Tian et al., 2017). There are substances capable of altering mitochondrial polarization (Sakamuru et al., 2016). One of the mechanisms is the uncoupling of protons, which allows the flow of protons through the mitochondrial membrane independent of adenosine triphosphate (ATP) synthesis, which was generated by the use of FCCP. Another mechanism is the blocking of mitochondrial ATP formation by the action of oligomycin A. Its mechanism of action is related to the binding to the proton channel in the Fo portion of ATP synthase. As a result, oligomycin A blocks mitochondrial ATP synthesis, proton translocation and oxygen binding (Hearne et al., 2020; Lippe et al., 2019). TMRE is used to quantify changes in MMP in living cells, by

flow cytometry, by labeling active mitochondria. TMRE is a red/orange dye capable of permeating into cells. This substance is positively charged, which causes it to readily accumulate in active mitochondria, due to its relative negative charge. Depolarized or inactive mitochondria have reduced membrane potential and do not sequester the TMRE. Our results from fungal cells treated with extract and nystatin indicated a reduced membrane potential by depolarized membranes relative to untreated cells. These findings indicate that there was no binding of TMRE at the mitochondrial membrane, and consequently, a reduction in the mean fluorescence intensity was observed, demonstrating the mitochondrial depolarization induced by the treatments. Therefore, AME has shown a high modulating effect on antifungal activity, highlighting changes in both virulence and the cell envelope of *C. albicans*.

For a better understanding of plant drugs, it is important to perform phytochemical profiling with a maximum number of markers available for an extract. Species of the genus *Annona*, are known for the presence of acetogenins and alkaloids, which have antifungal, antibacterial and cytotoxicity activities previously reported in the literature (Coria-Télez et al., 2018; Quílez et al., 2018; Nugraha et al., 2019; Pinto et al., 2017). To identify these and other chemical constituents, which could be related to antifungal activity, we investigated the chemical profile of AME by *UFLC-QTOF-MS* analysis. Fourteen compounds were identified in AME: rutin, xi-anomuricine, kaempferol-3-O-rutinoside, nornuciferine, xylopine, atherosperminine, caffeic acid, asimilobine, snorcorydine, loliolide, annohexocin, anomuricin, annopentocin and sucrose, and some of them have well-known antifungal activity (Quílez et al., 2018). The flavonoids identified have recognized antifungal activity (Han, 2009; Rocha et al., 2019; Tatsimo et al., 2012), such as does xylopine, a benzyloquinoline alkaloid (Villar et al., 1986) and caffeic acid (Rossato et al., 2021; Sardi et al., 2016).

This is the first record of activity against *Candida albicans* for the chemical composition of the extract under study. Thus, based on these literature data, the chromatographic analysis of AME suggests that the afore mentioned compounds may be responsible for the antifungal activity against multi-drug resistant *C. albicans* found for *A. muricata* extract, and, could be acting in synergism with one another present in the extract.

## 5. Conclusion

The chemical characterization of the ethanolic extract from *Annona muricata* leaves (AME) revealed the presence of alkaloids, flavonoids, acetogenins, phenolic acids, benzofurans, and disaccharides. AME showed significant antifungal activity against fluconazole-, itraconazole-, voriconazole-, and anidulafungin-resistant *C. albicans* (ATCC® 10231™). The *in vitro* antifungal results of AME indicate that the extract was able to reduce cell density, modify the fungal growth curve, and act on the cell envelope of the fungal cell. Furthermore, AME significantly increased cell permeability, reaching the cell wall and altering the membrane structures of the fungal cell. We also observed changes in the mitochondrial membrane potential, resulting in its depolarization. These results reinforce the popular use of the species for infectious diseases, elucidating the mechanism of action in the fight against *Candida albicans* and opening perspectives for the expansion of new therapies, such as the development of formulations applicable in antifungal treatment, including the fight against virulence factors, such as biofilms.

### Author's contributions

R.L.F., E.D.H., T.P.S., and R.C.N.M. conceived and designed the experiments; L.M.C., A.S.O.L., I.O.M.D., L.A.C., and P.R.D. performed the experiments; L.M.C., T.P.S., and R.L.F. analyzed the data; R.L.F., E.D.H., and R.C.N.M. contributed to the reagents/materials; R.L.F., L.M.C., and T.P.S. wrote the paper. All authors have read, edited, and agreed to the published version of the manuscript.

### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

### Funding

This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Grant Number: APQ-01357-21 to Rodrigo L. Fabri). Scholarships were provided by the Federal University of Juiz de Fora

(UFJF/Brazil and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil).

### Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Vinícius Antônio de Oliveira Dittrich from the Department of Botany/Federal University of Juiz de Fora for the botanical identification of the species and to Delfino Antônio Campos from the Department of Biochemistry/Federal University of Juiz de Fora for technical support.

### References

- Adewole, S., Ojewole, J., 2009. Protective effects of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) leaf aqueous extract on serum lipid profiles and oxidative stress in hepatocytes of streptozotocin-treated diabetic rats. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.*, 6(1). <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v6i1.57071>.
- Baena-Santillán, E. S., Piloni-Martini, J., Santos-López, E. M., Gómez-Aldapa, C. A., Rangel-Vargas, E., Castro-Rosas, J., 2021. Comparison of the antimicrobial activity of *Hibiscus sabdariffa* calyx extracts, six commercial types of mouthwashes, and chlorhexidine on oral pathogenic bacteria, and the effect of *Hibiscus sabdariffa* extracts and chlorhexidine on permeability of the bacterial membrane. *J. Med. Food*, 24(1), 67-76. <https://doi.org/10.1089/jmf.2019.0273>.
- Belanger, C. R., Hancock, R. E., 2021. Testing physiologically relevant conditions in minimal inhibitory concentration assays. *Nat. Protoc.*, 16(8), 3761-3774. <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00572-8>.
- Bouarab, L., Degraeve, P., Bouajila, J., Cottaz, A., Jbilou, F., Joly, C., Oulahal, N., 2021. *Staphylococcus aureus* membrane-damaging activities of four phenolics. *FEMS Microbiol. Lett.*, 368(13), fnab081. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnab081>.
- Campos, L. M., de Melo, L., Lemos, A. S., Guedes, M. C. M., Silva, T. P., Figueiredo, G. F., Reis, J.L., Rocha, V.N., Melo, R.C.N., Araujo, M.G.F., Apolônio, A.C.M., Scio, E., Fabri, R. L., 2018. *Mitracarpus frigidus*: a promising antifungal in the treatment of vulvovaginal candidiasis. *Ind. Crops. Prod.* 123, 731-739. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.038>.
- Campos, L. M., Lemos, A. S., Paula, P. L., Souza, T. F., Silva, T. P., Rocha, V. N., Apolônio, A. C. M., Pinto, P. F., Melo, R. C. N., Fabri, R. L., 2021. Methanolic extract of *Mitracarpus frigidus* inhibits filamentation and biofilm mode of growth from multidrug resistant *Candida albicans*. *Industrial Crops and Products*, 172, 114074. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114074>.

Cesar, K. K. F. A., Batista, A. K. R., Paula, L. R., da Silva, R. T., da Silva, F. L., 2021. Ação antifúngica de extratos e frações de *Annona muricata* L. sobre *Candida* spp. Res., Soc. Dev., 10(5), e28010514938-e28010514938. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i5.14938>

Chen, H., Zhou, X., Ren, B., Cheng, L., 2020. The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. Virulence, 11(1), 337-348. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1748930>.

Clinical Standard Laboratory Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement M100-S24. CLSI, 2017.

Coria-Téllez, A. V., Montalvo-González, E., Yahia, E. M., & Obledo-Vázquez, E. N. 2018. *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. Arabian J. Chem., 11(5), 662-691. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.01.004>.

Essid, R., Hammami, M., Gharbi, D., Karkouch, I., Hamouda, T. B., Elkahoui, S., Limam, F., Tabbene, O., 2017. Antifungal mechanism of the combination of *Cinnamomum verum* and *Pelargonium graveolens* essential oils with fluconazole against pathogenic *Candida* strains. Appl. Microbiol. Biotechnol., 101(18), 6993-7006. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8442-y>.

Foerster, S., Unemo, M., Hathaway, L. J., Low, N., Althaus, C. L., 2016. Time-kill curve analysis and pharmacodynamic modelling for in vitro evaluation of antimicrobials against *Neisseria gonorrhoeae*. BMC Microbiol., 16(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0838-9>.

Freire, J. C. P., Júnior, J. K. D. O., Silva, D. D. F., Sousa, J. P. D., Guerra, F. Q. S., de Oliveira Lima, E., 2017. Antifungal activity of essential oils against *Candida albicans* strains isolated from users of dental prostheses. Evid. Based Complement. Alternat. Med., 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/7158756>.

Frost, D. J., Brandt, K. D., Cugier, D., Goldman, R., 1995. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. J. Antibiot, 48(4), 306-310. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.48.306>.

Gavamukulya, Y., Wamunyokoli, F., El-Shemy, H. A., 2017. *Annona muricata*: Is the natural therapy to most disease conditions including cancer growing in our backyard? A systematic review of its research history and future prospects. Asian Pac. J. Trop. Med., 10(9), 835-848. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.08.009>.

Gintjee, T. J., Donnelley, M. A., Thompson, G. R., 2020. Aspiring antifungals: review of current antifungal pipeline developments. J. Fungi, 6(1), 28. <https://doi.org/10.3390/jof6010028>.

Han, Y., 2009. Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. *Int. Immunopharmacol.*, 9(2), 207-211.

<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.11.002>

Hans, S., Fatima, Z., Hameed, S., 2019. Retrograde signaling disruption influences ABC superfamily transporter, ergosterol and chitin levels along with biofilm formation in *Candida albicans*. *J. Mycol. Med.*, 29(3), 210-218.

<https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2019.07.003>.

Hearne, A., Chen, H., Monarchino, A., Wiseman, J. S., 2020. Oligomycin-induced proton uncoupling. *Toxicol. in Vitro*, 67, 104907.

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104907>.

Ingham, C. J., Boonstra, S., Levels, S., De Lange, M., Meis, J. F., Schneeberger, P. M., 2012. Rapid susceptibility testing and microcolony analysis of *Candida* spp. cultured and imaged on porous aluminum oxide. *PLoS One*, 7(3), e33818.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033818>.

Jamiu, A. T.; Albertyn, J., Sebolai, O. M., Pohl, C. H., 2021. Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. *Med. Mycol.* 59(1), 14-30.

<https://doi.org/10.1093/mmy/myaa031>.

Joux, F., Lebaron, P., 2000. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes Infect.*, 2(12), 1523-1535.

[https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)01307-1](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01307-1)

Khan, M. S. A., Ahmad, I., Cameotra, S. S., 2013. Phenyl aldehyde and propanoids exert multiple sites of action towards cell membrane and cell wall targeting ergosterol in *Candida albicans*. *Amb Express*, 3(1), 1-16. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-54>.

Kim, W. S., Han, J. M., Song, H. Y., Byun, E. H., Lim, S. T., Byun, E. B., 2020. *Annona muricata* L.-derived Polysaccharides as a potential adjuvant to a dendritic cell-based vaccine in a Thymoma-bearing model. *Nutrients*, 12(6), 1602.

<https://doi.org/10.3390/nu12061602>.

Kim, G. S., Zeng, L., Alali, F., Rogers, L. L., Wu, F. E., McLaughlin, J. L., Sastrodihardjo, S., 1998. Two new mono-tetrahydrofuran ring acetogenins, anomuricin E and muricapentocin, from the leaves of *Annona muricata*. *J. Nat. Prod.*, 61(4), 432-436. <https://doi.org/10.1021/np970534m>.

Leboeuf, M., Legueut, C., Cavé, A., Desconclois, J., Forgacs, P., Jacquemin, H., 1981. Alcaloïdes des Annonacées XXIX1: Alcaloïdes de *Annona muricata* L. (in French). *Planta Med.*, 42, 37-44. 10.1055/s-2007-971543.

Lee, H. S., Kim, Y., 2016. Antifungal activity of *Salvia miltiorrhiza* against *Candida albicans* is associated with the alteration of membrane permeability and (1, 3)- $\beta$ -D-glucan synthase activity. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 26(3), 610-617.

<https://doi.org/10.4014/jmb.1511.11009>.



Leite, D. O., de FA Nonato, C., Camilo, C. J., de Carvalho, N. K., da Nobrega, M. G., Pereira, R. C., da Costa, J. G., 2020. *Annona* genus: traditional uses, phytochemistry and biological activities. *Curr. Pharm. Des.*, 26(33), 4056-4091. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200325094422>.

Lemos, A. S., Florêncio, J. R., Pinto, N. C., Campos, L. M., Silva, T. P., Grazul, R. M., Pinto, P.F., Tavares, G.D., Scio, E., Apolônio, A.C.M., Melo, R.C.N., Fabri, R. L., 2020. Antifungal activity of the natural coumarin scopoletin against planktonic cells and biofilms from a multidrug-resistant *Candida tropicalis* strain. *Front. Microbiol.*, 1525. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01525>.

Lemos, A.S.O., Campos, L.M., Melo, L., Guedes, M.C.M.R., Oliveira, L.G., Silva, T.P., Melo, R.C.N., Rocha, V.N., Aguiar, J.A.K., Apolônio, A.C.M., Scio, E., Fabri, R.L., 2018. Antibacterial and antibiofilm activities of pychorubrin, a pyranonaphthoquinone isolated from *Mitracarpus frigidus* (Rubiaceae). *Front. Microbiol.* 9(724), 1-11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.0072>.

Lippe, G., Coluccino, G., Zancani, M., Baratta, W., Crusiz, P., 2019. Mitochondrial F-ATP synthase and its transition into an energy-dissipating molecular machine. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/8743257>.

Lone, S. A., Khan, S., Ahmad, A., 2020. Inhibition of ergosterol synthesis in *Candida albicans* by novel eugenol tosylate congeners targeting sterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) enzyme. *Arch. Microbiol.*, 202(4), 711-726. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01781-2>.

Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-275.

Mishra, S., Ahmad, S., Kumar, N., Sharma, B. K., 2013. *Annona muricata* (the cancer killer): a review. *Glob. J. Pharma. Res.*, 2(1), 1613-1618.

Moghadamtousi, S. Z., Fadaeinasab, M., Nikzad, S., Mohan, G., Ali, H. M., Kadir, H. A., 2015. *Annona muricata* (Annonaceae): a review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. *Int. J. Mol. Sci.*, 16(7), 15625-15658. <https://doi.org/10.3390/ijms160715625>.

Mutakin, M., Fauziati, R., Fadhilah, F. N., Zuhrotun, A., Amalia, R., Hadisaputri, Y. E., 2022. Pharmacological activities of Soursop (*Annona muricata* Lin.). *Molecules*, 27(4), 1201. <https://doi.org/10.3390/molecules27041201>.

Newman, D. J., 2017. The influence of Brazilian biodiversity on searching for human use pharmaceuticals. *J. Braz. Chem. Soc.*, 28, 402-414. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20160225>.

Niu, C., Wang, C., Yang, Y., Chen, R., Zhang, J., Chen, H., Zhuge, Y., Li, J., Cheng, J., Xu, K., Chu, M., Ren, C., Zhang, C., Jia, C., 2020. Carvacrol induces *Candida albicans* apoptosis associated with Ca<sup>2+</sup>/calcineurin pathway. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 10, 192. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.0019>.

Niu, Y. F., Li, K. X., Liu, J., 2020. The complete chloroplast genome of *Annona muricata* L.: a tropical fruit with important medicinal properties. *Mitochondrial DNA Part B*, 5(3), 3330-3332. <https://doi.org/10.1080/23802359.2020.1820394>.

Nugraha, A. S., Damayanti, Y. D., Wangchuk, P., Keller, P. A., 2019. Anti-infective and anti-cancer properties of the *Annona* species: their ethnomedicinal uses, alkaloid diversity, and pharmacological activities. *Molecules*, 24(23), 4419. <https://doi.org/10.3390/molecules24234419>.

Pai, B. M., Rajesh, G., Shenoy, R., Rao, A., 2016. Anti-microbial efficacy of soursop leaf extract (*Annona muricata*) on oral pathogens: an in-vitro study. *J. Clin. Diagn. Res.*, 10(11), ZC01. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/18329.8762>.

Pinto, N., Campos, L. M., Evangelista, A. C. S., Lemos, A. S., Silva, T. P., Melo, R. C., Lourenço, C. C., Salvador, M. J., Apolônio, A. C. M., Fabri, R. L. (2017). Antimicrobial *Annona muricata* L. (soursop) extract targets the cell membranes of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Ind. Crops Prod.*, 107, 332-340. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.054>.

Pippi, B., Lopes, W., Reginatto, P., Silva, F. É. K., Joaquim, A. R., Alves, R. J., Silveira, G.P., Vainstein, M.H., Andrade, S.F., Fuentefria, A. M., 2019. New insights into the mechanism of antifungal action of 8-hydroxyquinolines. *Saudi Pharm. J.*, 27(1), 41-48. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.07.017>.

Quílez, A. M., Fernández-Arche, M. A., García-Giménez, M. D., De la Puerta, R., 2018. Potential therapeutic applications of the genus *Annona*: Local and traditional uses and pharmacology. *J. Ethnoph.*, 225, 244-270. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.06.014>.

Rocha, M. F. G., Sales, J. A., da Rocha, M. G., Galdino, L. M., de Aguiar, L., Pereira-Neto, W. D. A., Cordeiro, R.A., Castelo-Branco, D. S. C. M., Sidrim, J. J. C., Brilhante, R. S. N., 2019. Antifungal effects of the flavonoids kaempferol and quercetin: A possible alternative for the control of fungal biofilms. *Biofouling*, 35(3), 320-328. <https://doi.org/10.1080/08927014.2019.1604948>.

Rossatto, F. C., Tharmalingam, N., Escobar, I. E., d'Azevedo, P. A., Zimmer, K. R., & Mylonakis, E., 2021. Antifungal activity of the phenolic compounds ellagic acid (EA) and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) against drug-resistant *Candida auris*. *J. Fungi*, 7(9), 763. <https://doi.org/10.3390/jof7090763>.

Sakamuru, S., Attene-Ramos, M. S., Xia, M., 2016. Mitochondrial membrane potential assay. In *High-throughput screening assays in toxicology* (pp. 17-22). Humana Press, New York, NY. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6346-1>.

Sardi, J. D. C. O., Gullo, F. P., Freires, I. A., de Souza Pitangui, N., Segalla, M. P., Fusco-Almeida, A. M., Mendes-Giannini, M. J. S., 2016. Synthesis, antifungal activity of caffeic acid derivative esters, and their synergism with fluconazole and nystatin against *Candida* spp. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 86(4), 387-391. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.08.002>.

Silva, T. P., Noyma, N. P., Duque, T. L., Gamalier, J. P., Vidal, L. O., Lobao, L. M., Chiarini, H.G., Roland, F., Melo, R.C.N., 2014. Visualizing aquatic bacteria by light and transmission electron microscopy. *Antonie van Leeuwenhoek*. 105 (1), 1-14. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0047-6>.

Shaw, D., Graeme, L., Pierre, D., Elizabeth, W., Kelvin, C., 2012. Pharmacovigilance of herbal medicine. *J. Ethnopharmacol.*, 140(3), 513-518. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.01.051>.

Tatsimo, S. J. N., Tamokou, J. D. D., Havyarimana, L., Csupor, D., Forgo, P., Hohmann, J., Kuate, J.R., Tane, P., 2012. Antimicrobial and antioxidant activity of kaempferol rhamnoside derivatives from *Bryophyllum pinnatum*. *BMC Research notes*, 5(1), 1-6. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-158>.

Tian, J., Lu, Z., Wang, Y., Zhang, M., Wang, X., Tang, X., PeNg, X., Zeng, H., 2017. Nerol triggers mitochondrial dysfunction and disruption via elevation of Ca<sup>2+</sup> and ROS in *Candida albicans*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 85, 114-122. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.02.006>.

Toledo, L. G. D., Ramos, M. A., Spósito, L., Castilho, E. M., Pavan, F. R., Lopes, É. O., Silva, I.C., Zocolo, G.J., Ribeiro, P.R., Oda, F.B., Pereira, J.A.S., dos Santos, A.G., Bauab, T.M. de Almeida, M. T., 2020. Profiling the *Cymbopogon nardus* ethanol extract and its antifungal potential against *Candida* species with different patterns of resistance. *J. Braz. Chem. Soc.*, 31, 1926-1938. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20200093>.

TPL, 2022. The Plant List. <http://www.theplantlist.org>. Last accessed 06/07/2022.

Van Daele, R., Spriet, I., Wauters, J., Maertens, J., Mercier, T., Van Hecke, S., Brüggemann, R., 2019. Antifungal drugs: what brings the future?. *Med. Mycol.* 57(Supplement\_3), 328-343. <https://doi.org/10.1093/mmy/myz012>.

Villar, A., Rios, J. L., Recio, M. C., Cortes, D., Cave, A., 1986. Antimicrobial activity of Benzylisoquinoline alkaloids. II. Relation between chemical composition and antimicrobial activity. *Planta medica*, 52(06), 556-557. <https://doi.org/10.1055/s-2007-969371>.

Wélé, A.; Zhang, Y.; Caux, C.; Brouard, J. P.; Pousset, J. L.; Bodo, B., 2004. Annomuricatin C, a novel cyclohexapeptide from the seeds of *Annona muricata*. *Comptes Rendus Chimie*, 7(10-11), 981-988. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2003.12.022>.

Zorić, N., Kosalec, I., Tomić, S., Bobnjarić, I., Jug, M., Vlainić, T., Vlainić, J., 2017. Membrane of *Candida albicans* as a target of berberine. *BMC Complement. Altern. Med.*, 17(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1773-5>.

**Table 1.** Compounds identified in the ethanolic extract from *A. muricata* leaves (AME) by UFLC-QTOF-MS in ESI (+).

Compound Classes	Compound names	Chemical formulae	Calculated mass	Mass found	Error (ppm)	Rt (Min)	Main fragments (m/z)	Reference
Saccharide	Sucrose	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	342.1162	342.1068	- 27.68	1.1	381.0700 (M+K <sup>+</sup> ); 203.0461 (M-Glic + Na <sup>+</sup> )	Cardozo et al., 2012
Flavonoid	Rutin	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	610.15346	610.1409	- 20.58	2.1	611.1482 (M+H); 303.0424 (M-Rha-Glic)	Matsushige et al., 2012a
Alkaloid	xi-Anomuricine	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>4</sub>	329.1628	329.1539	- 27.03	2.4	330.1612 (M+H)	Leboeuf et al., 1981
Flavonoid	Kaempferol-3O-rutinoside	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	594.1585	594.1461	- 20.95	2.7	595.1534 (M+H); 449.0961 (M-Rha)	Nawwar et al., 2012
Alkaloid	Nornuciferine	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>2</sub>	281.14166	281.1338	- 27.95	3.0	282.1411 (M+H)	Hasrat et al., 1997a; Hasrat et al., 1997b;
Alkaloid	Xylopine	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub>	295.1209	295.1129	- 27.14	3.4	296.1202 (M+H)	Fofana et al., 2011

Alkaloid	Atherosperminine	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>2</sub>	309.1729	309.1648	- 26.45	4.2	310.1721 (M+H); 223.1723 (M-HCN- 4CH <sub>3</sub> )	Leboeuf et al., 1981
Phenolic acid	Caffeic acid	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	180.0422	180.0518	52.87	4.4	203.0410 (M+Na); 181.0591 (M+H)	Nam et al., 2017
Alkaloid	Asimilobine	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>2</sub>	267.1260	267.1046	- 80.11	4.8	306.0678 (M+K <sup>+</sup> )	Hasrat et al., 1997a; Hasrat et al., 1997b;
Alkaloid	S- Norcorydine	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	327.1471	327.1388	- 25.49	5.7	328.1461 (M+H)	Matsushige et al., 2012b
Benzofuran	Loliolide	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	196.1100	196.1103	+1,47	8.2	197.11 76 (M+H)	Cárdenas et al., 2021
Acetogenin	Annohexocin	C <sub>35</sub> H <sub>64</sub> O <sub>9</sub>	628.4553	628.4555	+0.30	18.1	629.4628 (M+H)	Zeng et al., 1995
Acetogenin	Annomuricin A,C, or E	C <sub>35</sub> H <sub>64</sub> O <sub>8</sub>	612.4604	612.4603	-0,16	18.6	613.4676 (M+H)	Jaramillo et al., 2000; Kim et al., 1998; Wu et al., 1995.
Acetogenin	Annopentocin A, B, or C	C <sub>35</sub> H <sub>64</sub> O <sub>8</sub>	612.4604	612.4604	0.00	18.8	613.4677 (M+H)	Zeng et al., 1996

---

Rt - Retention time.

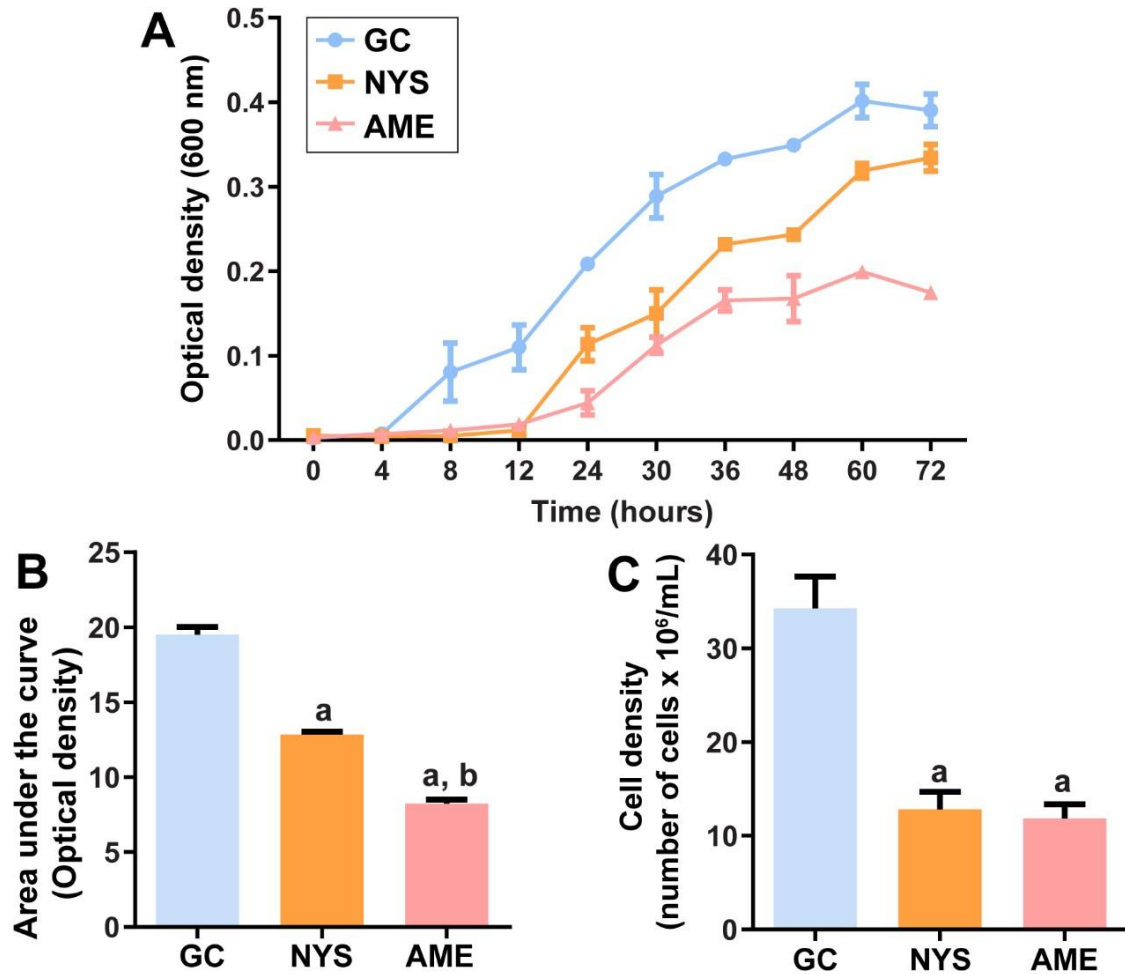
**Table 2** - Quantification of total proteins after membrane leakage in fungal cells treated with ethanolic extract from *A. muricata* leaves (AME) and nystatin.

<b>Samples</b>	<b>Total proteins (mg/mL)</b>
<b>AME</b>	1.39 <sup>a,b</sup> ± 0.08
<b>Nystatin</b>	1.03 <sup>a</sup> ± 0.1
<b>Growth control</b>	0.9 ± 0.05

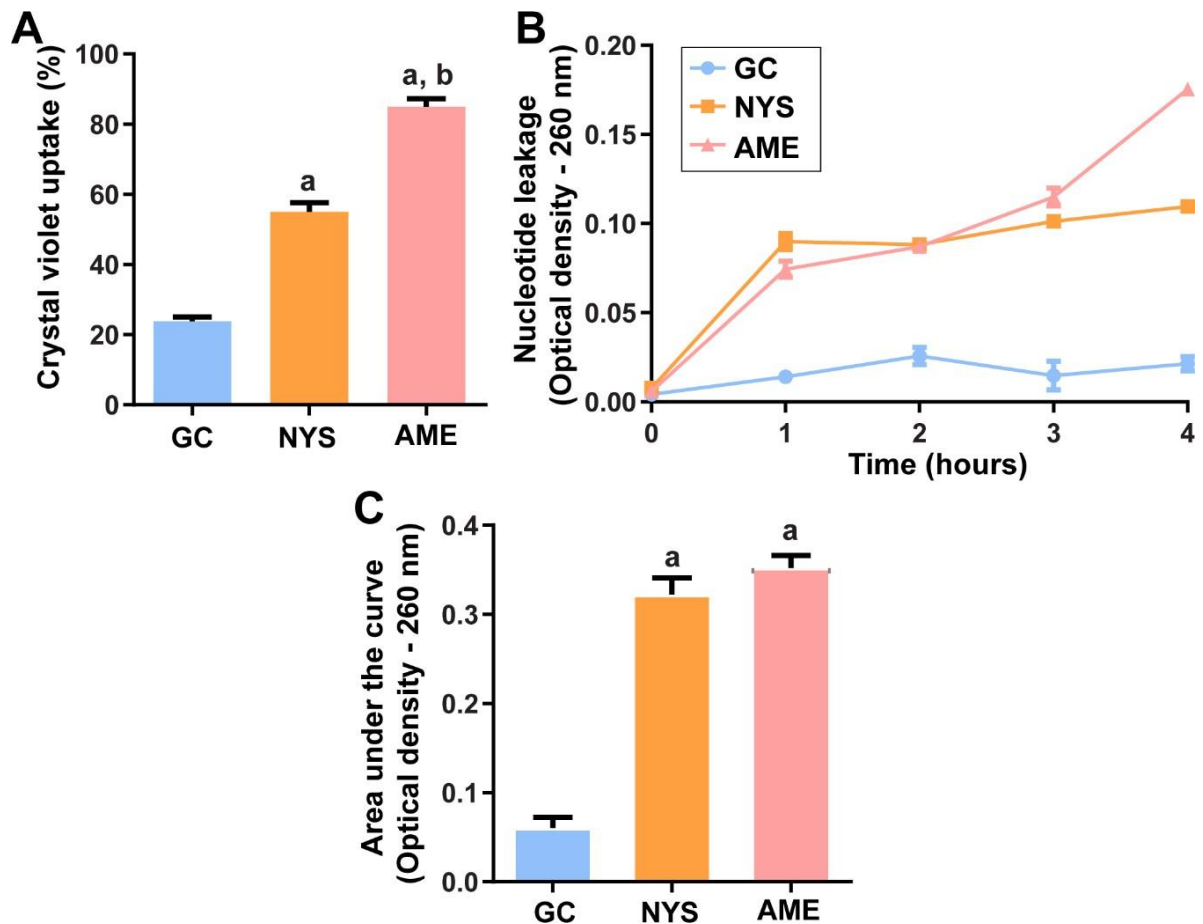
The letters indicate a statistically significant difference in relation to growth control (a) and nystatin (b) (ANOVA followed by Bonferroni,  $P < 0.05$ ). All experiments were performed in triplicate, and the data represent the mean ± SD.

**Table 3** - *In vitro* antifungal activity of ethanolic extract from *A. muricata* leaves (AME) against *C. albicans* in the presence and absence of sorbitol and exogen ergosterol for the microtiter dilution broth assay.

<b>Samples</b>	<b>MIC (µg/mL)</b>	<b>MIC with sorbitol (µg/mL)</b>	<b>MIC with ergosterol (µg/mL)</b>
<b>AME</b>	1000	8000	8000
<b>Nystatin</b>	2.5	-	20

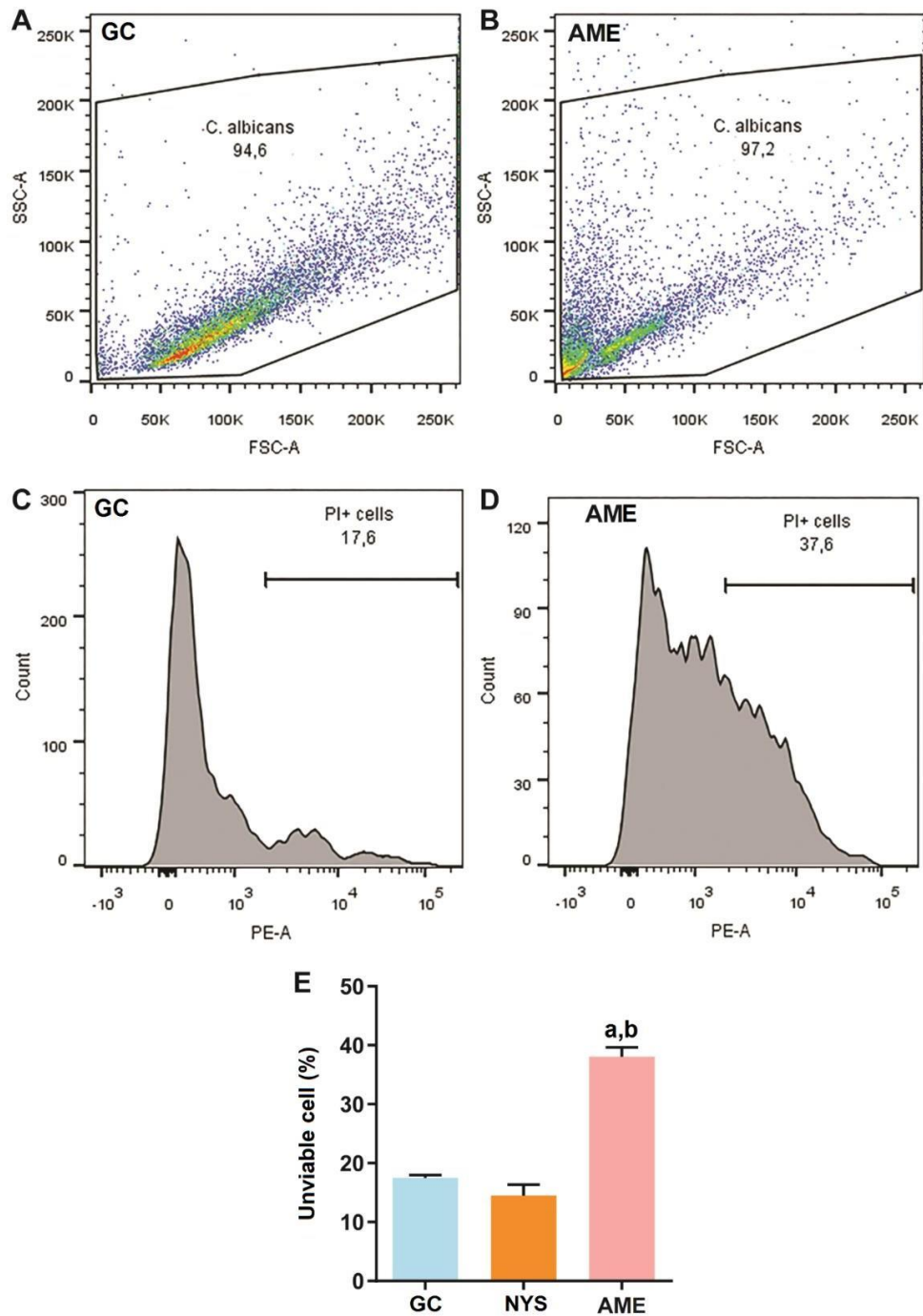


**Figure 1** - Fungal growth of *C. albicans* cultures treated with ethanolic extract from *A. muricata* leaves (AME) and nystatin (NYS). (A) Growth curves of treated and non-treated (growth control, CG) groups acquired by optical density. (B) Area under the curve analyses of growth curves. (C) Cell density of the growth control and treated groups at 24 h. Fungal cells were stained with DAPI and counted under fluorescence microscopy to assess cell density. The letters indicate a statistically significant difference in relation to growth control (GC) (a) and nystatin (NYS) (b) (ANOVA followed by Bonferroni,  $P < 0.05$ ). The experiments were performed in triplicate and the data represent the mean  $\pm$  SD.

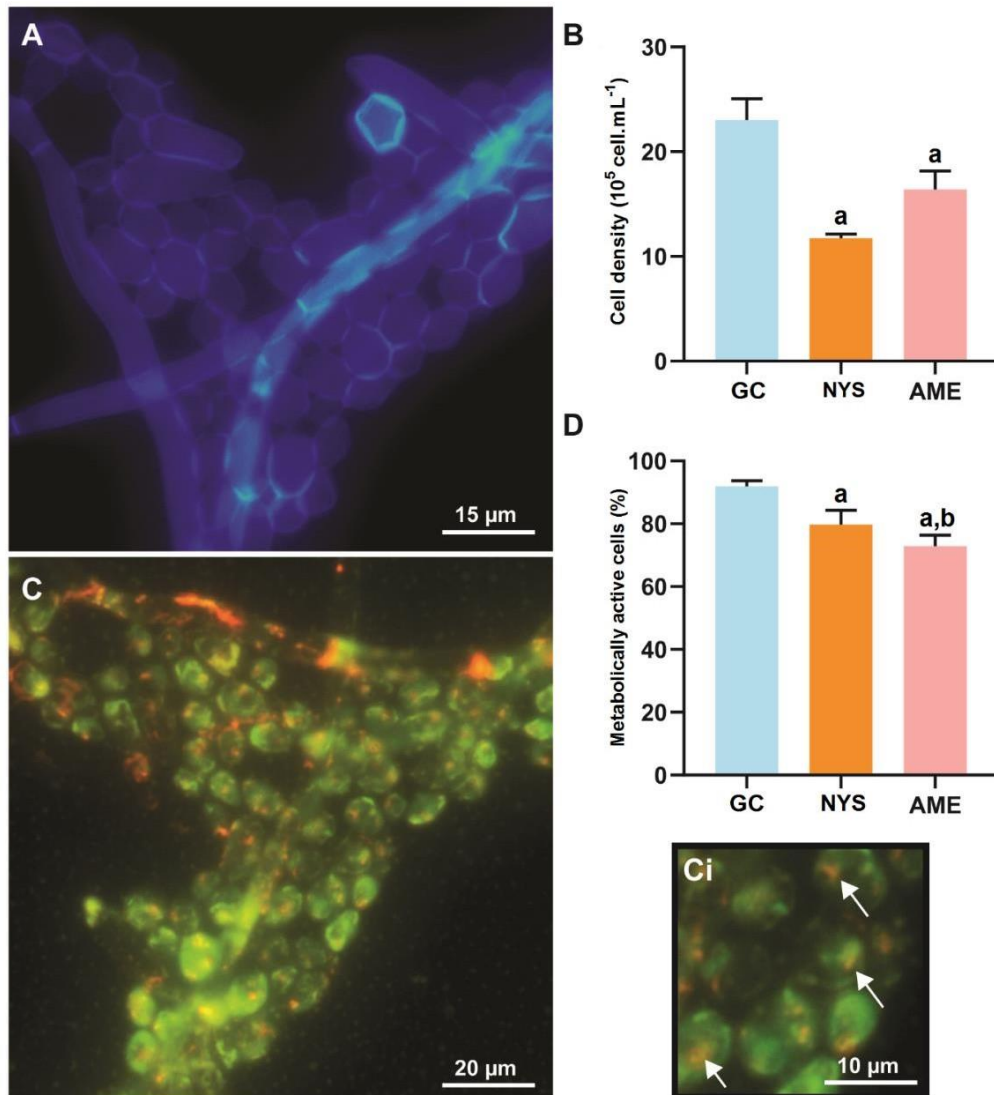


**Figure 2** - Effect of ethanolic extract from *A. muricata* leaves (AME) and nystatin (NYS) on *C. albicans* crystal violet uptake (A) and nucleotide leakage (B). In (A) is shown the graph of the mean proportion of crystal violet uptake by the yeast cells, which denotated cell membrane permeability. (B) Shows the kinetics of nucleotide leakage obtained by optical density along 4 h of control growth (CG) cultures and nystatin (NYS) and AME treated cultures. (C) Area under the curve analyses of kinetics of nucleotide leakage. The letters indicate a statistically significant difference in relation to growth control (GC) (a) and nystatin (NYS) (b) (ANOVA followed by Bonferroni,  $P < 0.05$ ). All experiments were performed in triplicate, and the data represent the mean  $\pm$  SD. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

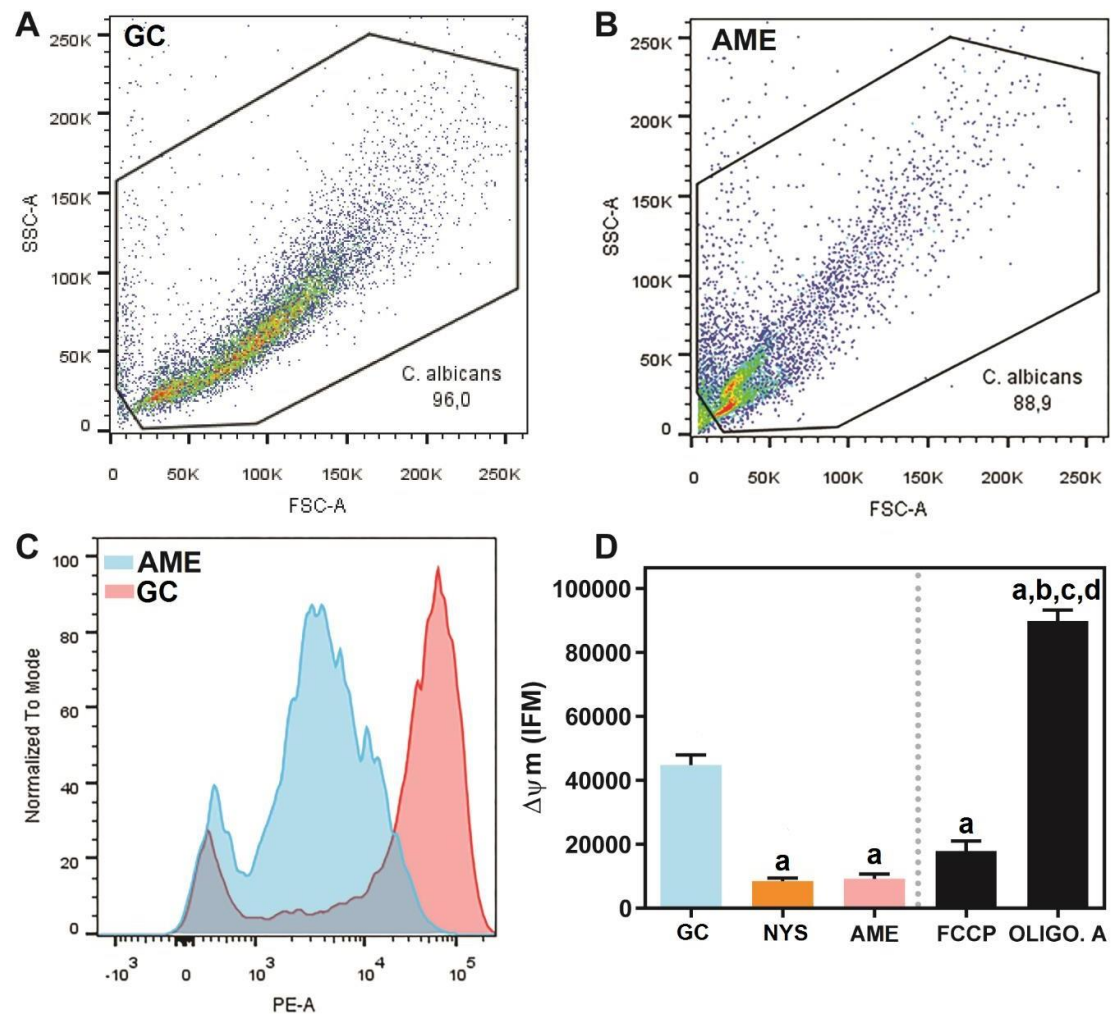




**Figure 3** - Activity of ethanolic extract from *A. muricata* leaves (AME) and nystatin (NYS) on free yeast cells stained with propidium iodide (PI) and analyzed by flow cytometry. (A and B) FSC x SSC dot plot graph; (C and D) histogram representing fluorescence intensity; (E) graph representing non-viable cells, where there was IP internalization. The letters indicate a statistically significant difference in relation to growth control (GC) (a) and nystatin (NYS) (b) (ANOVA followed by Bonferroni,  $P < 0.05$ ). All experiments were performed in triplicate, and the data represent the mean  $\pm$  SD.



**Figure 4** - Metabolic activity of *C. albicans* in planktonic cultures. In (A) observe a representative image of AME-treated yeast cells fluorescently marked with calcofluor white (CW), which stained intact cell walls. In (B) graph shows the number of yeasts with intact cell wall. In (C) observe FUN-1-stained yeast cells treated with AME. Note in detail (Ci) green active viable cells exhibiting intravesicular structures stained in red (arrowhead), while cells with low or no activity show diffuse yellow to green staining. (D) Shows the proportion of active cells. The letters indicate a statistically significant difference in relation to growth control (GC) (a) and nystatin (NYS) (b) (ANOVA followed by Bonferroni,  $P < 0.05$ ). All experiments were performed in triplicate, and the data represent the mean  $\pm$  SD. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)



**Figure 5** - Action of ethanolic extract from *A. muricata* leaves (AME) and nystatin (NYS) on the mitochondrial membrane potential of *C. albicans*. (A and B) FSC x SSC dot plot graph; (C) histogram representing fluorescence intensity; (D) Graph depicting the fluorescence intensity of cells treated with NYS, AME, FCCP and oligomycin A after TMRE labeling. The letters indicate a statistically significant difference in relation to growth control (a), NYS (b), AME (c), and FCCP (d) (ANOVA followed by Bonferroni,  $P < 0.05$ ). All experiments were performed in triplicate, and the data represent the mean  $\pm$  SD.

**6 CAPÍTULO 2 – ATIVIDADE ANTIBIOFILME DO EXTRATO ETANÓLICO DE *A. muricata*: ESTUDOS IN VITRO E IN VIVO EM UM MODELO DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL.**

**ARTIGO 2**

***In Vitro* and *In Vivo* antibiofilm potential of *Annona muricata* L. ethanolic extract against multi-drug resistant *Candida albicans***

**Manuscrito em preparação a ser submetido arevista “Journal of Ethnopharmacology”**

***In Vitro* and *In Vivo* antibiofilm potential of *Annona muricata* L. ethanolic extract against multi-drug resistant *Candida albicans***

Lara Melo Campos<sup>a</sup>; Ari Sérgio de Oliveira Lemos<sup>a</sup>; Irley Olívia Mendonça Diniz<sup>a</sup>; Thiago P. Silva<sup>b</sup>; Rossana Correa Netto de Melo<sup>b</sup>; Vinícius Novaes da Rocha<sup>c</sup>; Marcelo Gonzaga de Freitas Araújo<sup>d</sup>; Rodrigo Luiz Fabri<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Bioactive Natural Products Laboratory, Department of Biochemistry, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Campus, Juiz de Fora, MG, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Cellular Biology, Department of Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Campus, Juiz de Fora, MG, Brazil

<sup>c</sup> Department of Veterinary Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Juiz de Fora, Campus, Juiz de Fora, MG, Brazil

<sup>d</sup> Laboratory of Pharmacology, Federal University of São João Del-Rei, Campus Centro Oeste Dona Lindu, Divinópolis, MG, Brazil

**Abstract**

*Etnopharmacological relevance:* Traditional uses of *Annona muricata* L. (soursop) include treating cancer, fungal infections, and inflammatory diseases. Its phytoconstituents, such as acetogenins and alkaloids, are typically linked to the therapeutic activity investigated by their clinical application. However, the treatment for biofilms in vulvovaginal candidiasis (VVC) is limited and needs further studies.

*Aim of the study:* Evaluate the anti-biofilm activity of the ethanolic extract from *A. muricata* leaves against multiresistant *Candida albicans* (ATCC® 10231) *in vitro*-biofilms and in a VVC model.

*Material and methods:* Biofilm assays were carried out by proliferation and adhesion analysis, Scanning Electron Microscopy (SEM), Whole Slide Imaging (WSI) and matrix content analysis. The *in vivo* assays comprised experimental models of VVC.

*Results:* A reduction in proliferation, adhesion of *C. albicans* was observed, confirmed by SEM and WSI analyses. Furthermore, the concentration of carbohydrates, proteins and DNA was reduced in the biofilm matrix. *In vivo* assays demonstrated that AME was able to reduce the fungal burden and the inflammatory process.

*Conclusions:* The findings further emphasized the therapeutic and scientific potential of AME, opening new avenues for the treatment of infectious diseases and encouraging a challenge in the study of dermatological applications, paving the way for its future use in the treatment of VVC.

*Keywords:* *Annona muricata*; Vulvovaginal candidiasis; anti-biofilm; fungal cells.

## 1. Introduction

*Annona muricata* L. is a member of the Annonaceae family and has long been used as a traditional medicine for a variety of diseases. In tropical and subtropical regions, such as Southeast Asia, South America and African rainforests, where this plant frequently grows (Mutakin et al., 2022). Ethnobotanical reports have shown that parts of *A. muricata* are used as a remedy to several illness, such as cancer, diabetes, hypertension, fever and skin and respiratory diseases. In traditional medicine, *A. muricata* is broadly used as an antinflammatory and antiparasitic agents for the treatment of bacterial, fungal and helminthic infections (Hadisaputri et al., 2021).

Biologically active components from *A. muricata*, including primary and secondary metabolites, such as acetogenin, alkaloids, flavonoids coumarins, lactones, anthraquinones, glycosides, tannins, and phytosterols (Abdul Wahab et al., 2018; Hadisaputri et al., 2021). It is worth mentioning that secondary metabolites were discovered through chemical analysis of *A. muricata* leaf extract (Moghadamtousi et al., 2015). However, there are few reports of the antifungal activity of *A. muricata* leaves.

Among the pathologies caused by fungi, vulvovaginal candidiasis (VVC) stands out as the most frequent fungal infection in women. A fungus causes this disease from the genus *Candida*, especially *Candida albicans*. VVC is characterized by an inflammation of the vagina involving edema and swelling of the vulva. VVC causes intense itching and whitish discharge (Lopez, 2015; Yano et al., 2019). Symptoms are not always related to fungal burden and often could be associated with the arising of virulence factors (Rodriguez-Cerdeira et al., 2019).

Biofilm is considered as an essential factor in the pathogenesis of VVC. *C. albicans* biofilm in the vaginalmucosa, is characterized by a closed packed community of multiple fungal cell types (i.e. yeast, pseudohyphal and hyphal cells) encased in an

extracellular polymeric matrix. The complex three-dimensional architecture of biofilms provide resistance to chemical and physical insults (Pereira et al., 2021). Thus, *C. albicans* biofilms are inherently tolerant to treatment with antimicrobials (Ghannoum et al., 2015). This fact could become even more relevant given the growing of antifungal resistance to the conventional types of antifungal medicines (Fisher et al., 2018).

Because the largely resistance of fungal biofilms to current antifungal drugs is imperative the development of new therapies against *C. albicans* biofilms and VVC. Thus, in the present study we evaluated the anti-biofilm activity of the ethanolic extract from *A. muricata* leaves against a multiresistant *Candida albicans* (ATCC® 10231) in vitro and in a VVC model. The prospection of natural products from plants could potentially direct to the development of more potent and effective therapies against VVC. The recognition of the potential use of multi-component plant extract could provide the basis for further development of ethnic/traditional medicine as a valid, cheap and locally available means to treat candidiasis infections.

## 2. Material and methods

### 2.1 Plant material

In March 2018, the leaves of *A. muricata* L. were gathered in Recreio, Minas Gerais, Brazil. Dr. Vincius Antônio de Oliveira Dittrich from the Federal University of Juiz de Fora's Botany Department identified the plant (UFJF). Leopoldo Krieger Herbarium (CESJ 46006) at UFJF received the exsiccate and stored it there.

### 2.2 Preparation of the extract

The ethanolic extract of *A. muricata* was obtained according to Campos et al. (2022).

### 2.3 Fungal strain

The studies were performed using the *C. albicans* species (ATCC 10231), characterized for having resistance to itraconazole, voriconazole, anidulafungin and fluconazole (ATCC® 10231). Professor Marcelo Gonzaga de Freitas Araújo from the Universidade Federal de São João del Rey, *campus* Centro Oeste Dona Lindu, kindly

provided this microorganism for the study. The strain was cultured overnight at 35 °C in RPMI-1640 culture media before each experiment. All experiments and following analyzes were done in triplicates.

#### 2.4 Evaluation of AME effect on established biofilms by spectrophotometric assay

Biofilm proliferation assay was performed to determine whether AME treatment has action on the formation of preformed *Candida* biofilms. To create the *C. albicans* biofilm, a 96-well polystyrene microtiter plate filled with RPMI-1640, 1% glucose and fungal cells ( $10^6$  cells/mL) was used for 24 hours at 35 degrees Celsius. After cultivation, planktonic cells were eliminated, the wells were duly cleaned three times with distilled water and then 200 L of AME were added to each well (MIC value). For 24 hours, incubation was carried out at 35 °C. At time 0 and 24 hours after incubation, the OD was measured at 530 nm. Nystatin was used as a positive control in this test, while the SDB medium plus strains were used with growth control. The tests were done in triplicate. To calculate the percentage of biofilm inhibition, the OD values of the growth control group for each strain were compared with that of the treated group using the following equation:  $[(OD_{control}-OD_{treatment})/OD_{control}] \times 100$ . (Campos et al., 2021).

#### 2.5 Evaluation of AME effect on adherence of biofilms by spectrophotometric assay

The biofilm adhesion assay was performed according to Campos et al. (2021) in order to verify whether treatment with AME affects the adhesion phase of *C. albicans* biofilms. Briefly, nystatin and AME were incubated for 24 hours at 35°C with *C. albicans* cell suspensions ( $10^6$  CFU/mL) in 96-well polystyrene microtiter plates. Free-floating fungal cells were carefully removed by washing them with 200 µl of PBS. 0.1% crystal violet was used to stain the biofilms created by cells adhered to the wells, which were then left at room temperature for 30 minutes. After a PBS wash, the wells were fixed with 200 mL of 96% ethanol and then incubated for 15 min. Then, the biofilms were analyzed by spectrophotometry at absorbance of 590 nm. All experiments were performed in triplicate. The percentage of biofilm inhibition was calculated using the following equation:  $[(OD_{control}-OD_{treatment})/OD_{control}] \times 100$ .



## 2.6 Evaluation of AME effect on biofilm formation by scanning electron microscopy (SEM)

SEM was performed as previously mentioned (Lemos et al., 2018). In 24-well plates, AME (final concentration per well = MIC value) and  $10^6$  CFU/mL *C. albicans* cells were cultured on coverslips (Glasscyto®) with RPMI-1640 supplemented with 1% glucose. As negative and positive control group, respectively, sterile water and nystatin (MIC value) were used. Cells were fixed in cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.2) containing 2.5% glutaraldehyde (Riedelde-Haen, Germany). Samples were dehydrated with ethanol solutions, critical point dried in carbon dioxide, mounted on aluminum racks and sprayed with gold for ultrastructural examination (JEOL JSM-6390 LV, Tokyo, Japan). To study ultrastructural aspects of the surface of bacterial cells, electron micrographs were randomly taken at magnifications of 1,000×-20000×.

## 2.7 Evaluation of AME effect on the biofilm formation and development by WSI

This procedure is performed as before (Rass, 2021). The methodology of the adhesion and proliferation tests of the pre-formed biofilm were carried out, according to items 2.4 and 2.5. However, biofilms were grown in 24-well microtiter plates with glass coverslips (EMS, Hatfield, PA, USA). Biofilms on the coverslip surface were then fixed with 3.7% formaldehyde and stained with 10  $\mu$ L of DAPI (0.01 mg/L) for ten minutes after incubation (24 hours at 35°C). Each cover slip was fixed with double-sided tape (Tissue, 3 M), on the side opposite the biofilm, to a standard glass slide (Finest, Fisher Scientific) in preparation for WSI scanning. In this experiment, a Histech 3D Scan Panoramic scanner connected to a computer (3D HistechKft, Budapest, Hungary) was used to scan slides stained with DAPI (Fujitsu Technology Solutions GmbH, Munich, Germany). Using Panoramic Viewer 1.15.2 SP2 RTM software (3D Histechkft Budapest, Hungary), high-resolution images (300 DPI uncompressed RGB tiff files) were captured from fluorescence-scanned slides (DAPI) at various digital magnifications (1-100x). The proportions of coverslip areas occupied by the biofilms were measured using Fiji software (National Institute of Health, USA).

## 2.8 Biochemical composition of the extracellular polymeric matrix

As previously described by Lemos et al. (2018), the extracellular polymeric matrix of *C. albicans* biofilms was evaluated. To remove adherent biofilms, they were sonicated in an ultrasonic water bath for five minutes. Then, the cell suspensions were

pooled and centrifuged (3000 rpm for ten minutes). To better understand the biochemical composition of the extracellular polymeric matrix, the supernatant was used as a source. The following assays were used: eDNA purified by the phenol-chloroform method (Fox et al., 1994), protein content by the Lowry method (Lowry et al., 1951) and determination of carbohydrate concentration by phenol-sulfuric acid (Dubois et al., al., 1956).

## 2.9 Experimental model of vulvovaginal candidiasis (VVC)

In order to establish VVC, female Wistar rats weighing 150-200 g were intravaginally infected with *C. albicans* (Campos et al., 2018). Briefly stated, estrus phase was induced by subcutaneous treatment of estradiol cypionate (0.2 mg mL) once daily for four days prior to infection, and the animals (n=36) were immunosuppressed by administration of one dose of cyclophosphamide (CPA) (100 mg kg<sup>-1</sup> b.w.). Using a micropipette with disposable tips, 0.1 mL of *C. albicans* (10<sup>6</sup> cells/mL) was then injected intravaginally into the rats. The vaginal load of *C. albicans* was assessed using vaginal fluid and 0.1 mL of sterile saline on day zero following the inoculation, and the infection status was confirmed using the CFU test on Sabouraud Dextrose Agar to determine whether the infection was confirmed. If the mean count for the vaginal lavage cultures from each rat was at least 10<sup>3</sup> CFU/mL, the infection was deemed adequate. Six healthy animals acted as a control for infection. The Pharmacology Laboratory of the Federal University of São João Del-Rei (UFSJ - Campus Centro Oeste) kept the animals throughout the experiment. The Ethics Committee (CEUA/UFSJ; protocol 021/2021) gave its approval to this investigation, which was carried out in strict adherence to all internationally recognized ethical standards and in Brazil. Survival and welfare status of experimental rats were checked every day (home cage assessment [25 ± 1°C], light/dark cycle [12 hours], skin lesions and other general conditions). Before the conclusion of the experiment, not a single animal died.

### 2.9.1 Experimental vaginal topical treatment

Different concentrations of AME were topically applied (0.1 mL) to infected animals to study the effects of the extract on VVC. The reference antifungal used in treatment controls was nystatin (25000 UI/g; NYS) and 5% DMSO + 5% Tween 80 was used as vehicle. As shown in Table 1, experimental animals (n = 36 animals) were

equally divided among six experimental treatment groups. Treatments were given to the infected animals once daily for six days after the infection was confirmed (day one). In order to confirm the efficacy of the medication, the vaginal load of *C. albicans* was assessed on days three and six of the trial. The animals were put down on day seven, and samples of the vagina and vulva were taken for histological examinations. The collected organs were fixed in 10% formalin (formaldehyde in phosphate buffer, pH 7.4) and processed for analysis as described above (Campos et al., 2018).

### 2.10 Statistical analysis

Prism 6.0.1 software (GraphPad software, San Diego, CA, United States) was used to evaluate the statistical data and plotting of the graphs. ANOVA followed by the Bonferroni test ( $P < 0.05$ ) was used to compare the control and treated groups.

## 3. Results

### 3.1 Effect of AME on established and adhesion biofilm

AME showed activity on the pre-established biofilm, verified by the decrease in optical density. Analyzes indicated an 81% ( $P < 0.05$ ) reduction in biofilm proliferation when treated with AME and 96% ( $P < 0.05$ ) when treated with nystatin. The statistics showed a significant difference between the tested samples. The effect of AME and nystatin on biofilm adhesion was also observed. The results were expressed from the optical density referring to the amount of crystal violet that was used to stain the cells adhered to the microplate. Treatments with AME and nystatin were able to reduce the adhered *C. albicans* biofilm by 78% ( $P < 0.05$ ) for both (Figure 1).

### 3.2 Surface Ultrastructure of *C. albicans* biofilms

SEM allow the visualization of details of fungal cell density and ultrastructure. When we analyzed the biofilm without any treatment, we observed a high density of cells represented by microscopic fields completely filled with yeast (Figure 2A). When the biofilm is cultured with nystatin (Figure 2B) or AME (Figure 2C), we observe a decrease in the number of fungal cells. The alteration of the cell's ultrastructure can be observed in treatment with AME (Figure 2F), evidenced by a damaged/corrugated surface (Figure 2Fi and Fig. Therefore, we have consistently observed by SEM that AME treatment leads to a large reduction in *C. albicans* biofilm formation.

### 3.3 Analysis of the effects of AME on biofilms by WSI

WSI enable the visualization of the biofilms architecture and revealed that nystatin treatment significantly decreased adhesion and establishment *C. albicans* biofilms (Figure 3). Our quantitative analyses showed that the extent of biofilm in preformed biofilm cultures treated with nystatin or AME were decreased by 21.3% and 58.9% ( $P < 0.05$ ), respectively, compared to the growth control. In addition, nystatin and AME treatment significantly reduced the biofilm adhesion in 41.9% and 73.2% ( $P < 0.05$ ), respectively. .

### 3.4 Effect on biofilm matrix composition

The biochemical composition of extracellular polymeric matrix was measured and it was observed that there was a significant reduction in carbohydrate and protein concentrations when treated with AME or nystatin. However, the eDNA content was significantly reduced with AME treatment when compared to nystatin (Table 2).

### 3.5 Treatment of VVC

We showed that the fungal load rose and remained high during the entire treatment period in the group of animals that were either infected and untreated (infected only) or infected and treated with vehicle control only. Five animals were still infected at the end of the treatment in the group given AME 0.2 mg/mL, despite a reduction in the fungus load. On the other hand, the AME 1.0 mg/mL group considerably reduced the fungal load; on the sixth day after starting treatment, just two animals were still infected, indicating a reduction of almost 60%. On the final day of treatment, the fungus burden was completely eliminated by treatment with NYS, which was utilized as a positive control.

In comparison to the infected control group, which displayed enhanced vaginal mucosal inflammation and vacuolation, the uninfected control group displayed normal vaginal mucosal morphology and showed no symptoms of inflammation (Figure 4A). Infected animals that had been exposed to vehicles displayed degenerative alterations and cell death (Figure 4B). Keratinocyte degeneration and cell death were less noticeable in mice treated with AME (Figure 4D and 4E). In addition to areas of mild hyperkeratosis and hyperplasia (acanthosis) of the mucosa, most animals in the infected group treated with nystatin appeared to have higher inflammation than the infection alone (Figure 4F).

## 4. Discussion

*A. muricata* extract is reported in this work as a viable strategy to combat proliferation and adhesion of biofilms *in vitro* and in VVC *in vivo* model. The antifungal activity is related to the phytochemical profile of the extract (Campos et al., 2022). Acetogenins and alkaloids are the main classes found, showing activity in the cell envelope of *C. albicans*, as it alters membrane permeability and mitochondrial membrane potential (Campos et al., 2022). Other classes were also evidenced, such as phenolic compounds and terpenes. In the literature, we can find reports of anti-inflammatory, antioxidant, antihypertensive, antiparasitic activities and several studies of anticancer activity (Moghadamtous et al., 2015; Rady et al., 2018; Manrique-de-la-Cuba et al., 2019).

Our SEM and WSI findings can be considered as promising, since AME was able to reduce the pre-established biofilm and interfere with its adhesion. Consequently, cell densities within the biofilm were reduced and nutrients were limited (Khan et al., 2021). In the adhesion phase, a basal layer of isolated yeast cells is adhered to the substrate. In the next stage, of proliferation, we have the initiation stage, and there is the development of other morphological forms, invading the host's mucosa. Under most *in vitro* experimental conditions, the biofilm is considered mature for approximately 24 hours and is characterized by a structured mixture of yeast cells, pseudohyphae and true hyphae surrounded by an extracellular matrix composed of proteins, carbohydrates, lipids and nucleic acids. (Wall et al., 2019).

Previous studies discuss the ability of biofilms in acquire resistant characteristics, such as colonization of host tissues, expression of virulent characteristics, metabolic cooperation, efficient capture of nutrients, cell-cell communication and exchange of genetic material, which provides a considerable ecological advantage, as it protects against antifungals. Thus, genes involved in biofilm formation and development, as well as quorum-sensing systems, are considered new targets in the development of specific inhibitors as an alternative to currently available treatments (Rodriguez-Cerdeira et al., 2020).

According to Alvendal et al. (2021), women with VVC form a biofilm, but treatment with fluconazole has no impact on this structure or on yeast growth in the already established biofilm. Therefore, innovative treatment alternatives to disperse

the biofilm and make microorganisms vulnerable, as well as preventing the formation and adhesion of new biofilms, are relevant.

The tests carried out demonstrated the efficiency of AME in disturbing pre-formed biofilms and decreasing their adhesion. In the microscopy analyses, different fields were observed, which suggest a reduction in the number of cells. These results corroborate the data presented in the biofilm proliferation and adhesion inhibition assay performed by spectrophotometry. The apparent structure of biofilms when treated with AME or nystatin was modified, showing channels and openings, which may indicate cell destruction in these regions, where the extract was able to penetrate (RAAS et al., 2021; SILVA et al., 2019).

Considering some essential characteristics in a biofilm, we can consider the matrix formation as an essential environment for the maintenance of the fungal population. The extracellular polymeric matrix is formed by the predominance of polysaccharides, cells themselves, components of the environment (debris and inorganic matter, for example), proteins, nucleic acids, glycoproteins and phospholipids (Khan et al., 2019). Therefore, its reduction can be considered an important feature of an antifungal agent (Namasivayam and Roy, 2013). In addition, the restriction of some element of the matrix composition leads to the weakening of the biofilm, which facilitates the entry of drugs (Cavalheiro et al., 2018; Joseph, 2003).

The action of extracellular polymeric matrix suggested explaining the resistance of biofilms to antimicrobial agents that acts as an adsorbent, sequestering antifungal molecules and preventing their penetration into the biofilm (Lal et al., 2010). The tests carried out allowed investigating a possible action of AME on the composition of the polymeric matrix. The sample was found to reduce carbohydrates, proteins and DNA. The results were promising, as it is extremely important to understand the mechanisms that support the growth of the biofilm, to justify and reach these structures, in order to inhibit the synthesis of the matrix, especially interfering in the reduction of this compound.

The VVC model reinforces the potential of AME against fungal infections. At its highest concentration, the extract was able to reduce the fungal load to a satisfactory level and through histopathological analysis, we observed a tissue similar to a normal animal (without infection), unlike the photomicrograph of nystatin, where changes were observed in the stratum corneum. The ability of *C. albicans* to form biofilms is crucial for its pathogenicity and therefore should be considered an important virulence factor

in VVC (de Barros et al., 2020). Rodents are one of the most useful animals to study candidiasis, since the disease process and host immune responses are similar to those in humans (Yano and Fidel, 2011). *In vivo* studies in murine VVC models are commonly used to study infection by *C. albicans*, as these models allow investigating the virulence factors associated with *C. albicans*, evaluating the histopathological profile and detecting anti-inflammatory activity in the tissue (Rodriguez-Cerdeira et al., 2020).

## 5. Conclusion

*C. albicans* biofilms have considerable clinical repercussions in VVC due to the increase in frequency in the resistance to antifungals, therefore AME appears as an alternative in the treatment. According to the results, we can observe a reduction in the proliferation and adhesion of pre-formed biofilms, in addition to changing the ultrastructure of the yeast. *In vivo* assays demonstrate a reduction in the fungal charge and the inflammatory process.

The potential, *in vitro* and *in vivo*, antifungal activity of AME against a multi-drug resistant *C. albicans*, reported in the present study, contributes to the further development of new natural product-based formulations for candidiasis therapy. Moreover, the recognition of the antifungal activity of AME could provide the basis for further development of ethnic/traditional medicine as a valid, cheap and locally-available means to treat VVC.

## Conflict of interest

The authors declare no competing financial interest.

## Funding

This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (408700/2021-1 for Rodrigo L. Fabri) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (APQ-01357-21 for Rodrigo L. Fabri). Scholarships were provided by the Federal University of Juiz de Fora (UFJF/Brazil) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil).

## Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Vinícius Antônio de Oliveira Dittrich from the Department of Botany/Federal University of Juiz de Fora for the botanical identification of the species and to Delfino Antônio Campos from the Department of Biochemistry/Federal University of Juiz de Fora for technical support.

## References

Abdul Wahab, S. M., Jantan, I., Haque, M. A., & Arshad, L., 2018. Exploring the leaves of *Annona muricata* L. as a source of potential anti-inflammatory and anticancer agents. *Front. Pharmacol.*, 9, 661.

Alvental, C.; Mohanty, S.; Bohm-Starke, N.; Brauner, A., 2020. Anti-biofilm activity of chlorhexidine digluconate against *Candida albicans* vaginal isolates. *Plos one*, 15(9), p. e0238428.

ATCC, The Essentials of life science research. Disponível em: <<https://www.atcc.org/Products/All/10231.aspx>>. Acesso em: 13 dez. 2022.

Campos, L. M., de Melo, L., Lemos, A. S., Guedes, M. C. M., Silva, T. P., Figueiredo, G. F., Reis, J.L., Rocha, V.N., Melo, R.C.N., Araujo, M.G.F., Apolônio, A.C.M., Scio, E., Fabri, R. L., 2018. *Mitracarpus frigidus*: a promising antifungal in the treatment of vulvovaginal candidiasis. *Ind. Crops. Prod.* 123, 731-739.

Campos, L. M., Lemos, A. S., Diniz, I. O., Carvalho, L. A., Silva, T. P., Dib, P. R., Hottz, E. D.; Chedier, L. M.; Melo, R. C. N.; Fabri, R. L., 2023. Antifungal *Annona muricata* L.(soursop) extract targets the cell envelope of multi-drug resistant *Candida albicans*. *Journal of Ethnopharmacology*, 301, 115856.

Campos, L. M., Lemos, A. S., Paula, P. L., Souza, T. F., Silva, T. P., Rocha, V. N., Apolônio, A. C. M., Pinto, P. F., Melo, R. C. N., Fabri, R. L., 2021. Methanolic extract of *Mitracarpus frigidus* inhibits filamentation and biofilm mode of growth from multidrug resistant *Candida albicans*. *Industrial Crops and Products*, 172, 114074.

Cavalheiro, M., Teixeira, M. C., 2018. *Candida* biofilms: threats, challenges, and promising strategies. *Front. Med.*, 5(28).

de Barros, P. P., Rossoni, R. D., de Souza, C. M., Scorzoni, L., Fenley, J. D. C., Junqueira, J. C., 2020. *Candida* biofilms: an update on developmental mechanisms and therapeutic challenges. *Mycopathol.*, 185(3), 415-424.

Fisher, M. C., Hawkins, N. J., Sanglard, D., & Gurr, S. J., 2018. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science*, 360(6390), 739-742.



- Ghannoum, M., Roilides, E., Katragkou, A., Petraitis, V., Walsh, T. J., 2015. The role of echinocandins in *Candida* biofilm-related vascular catheter infections: in vitro and in vivo model systems. *Clin. Infect. Dis.*, 61(suppl\_6), S618-S621.
- Hadisaputri, Y. E., Habibah, U., Abdullah, F. F., Halimah, E., Mutakin, M., Megantara, S., Diantini, A., 2021. Antiproliferation activity and apoptotic mechanism of soursop (*Annona muricata* L.) leaves extract and fractions on mcf7 breast cancer cells. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 13, 447.
- Joseph, R. L., 2003. Prosthetic joint infections: bane of orthopedists. *Clin. Infect. Dis.*, 36, 1157-1161.
- Khan, F., Bamunuarachchi, N. I., Tabassum, N., Jo, D. M., Khan, M. M., & Kim, Y. M. 2021. Suppression of hyphal formation and virulence of *Candida albicans* by natural and synthetic compounds. *Biofouling*, 37(6), 626-655.
- Lal, P.; Sharma, D.; Pruthi, P.; Pruthi, V., 2010. Exopolysaccharide analysis of biofilm-forming *Candida albicans*. *J. Appl. Microbiol.*, 109(1), 128-136.
- Lee, Y., Puumala, E., Robbins, N., Cowen, L. E., 2020. Antifungal drug resistance: molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond. *Chem. Rev.*, 121(6), 3390-3411.
- Lemos, A.S.O., Campos, L.M., Melo, L., Guedes, M.C.M.R., Oliveira, L.G., Silva, T.P., Melo, R.C.N., Rocha, V.N., Aguiar, J.A.K., Apolônio, A.C.M., Scio, E., Fabri, R.L., 2018. Antibacterial and antibiofilm activities of pychorubrin, a pyranonaphthoquinone isolated from *Mitracarpus frigidus* (Rubiaceae). *Front. Microbiol.* 9(724), 1-11.
- Lopez, J. E. M., 2015. Candidiasis (vulvovaginal). *BMJ clinical evidence*, 2015.
- Manrique-de-la-cuba, M.F.; Gamero-Begazo, P.; Valencia, D.E.; Barazorda-Ccahuana, H.L.; Gomez, B., 2019. Theoretical study of the antioxidant capacity of the flavonoids present in the *Annona muricata* (Soursop) leaves. *J. Mol. Model.*, 25(7), 1-13.
- Moghadamtousi, S. Z., Fadaeinasab, M., Nikzad, S., Mohan, G., Ali, H. M., Kadir, H. A., 2015. *Annona muricata* (Annonaceae): a review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. *I. J. Mol. Sci.*, 16(7), 15625-15658.
- Mutakin, M.; Fauziati, R.; Fadhilah, F. N., Zuhrotun, A., Amalia, R., & Hadisaputri, Y. E., 2022. Pharmacological Activities of Soursop (*Annona muricata* Lin.). *Molecules*, 27(4), 1201.
- Namasivayam, S. K. R.; Roy, E. A., 2013. Anti biofilm effect of medicinal plant extracts against clinical isolate of biofilm of *Escherichia coli*. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 5, 486-489.

Pereira, R., dos Santos Fontenelle, R. O., de Brito, E. H. S., & de Morais, S. M., 2021. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. J. Appl. Microbiol., 131(1), 11-22.

Raas, M. W., Silva, T. P., Freitas, J. C., Campos, L. M., Fabri, R. L., Melo, R. C., 2021. Whole slide imaging is a high-throughput method to assess *Candida* biofilm formation. Microbiol. Res., p. 126806, 2021.

Rady, I., Bloch, M.B., Chamcheu, R.C.N., Mbeumi, S.B., Anwar, M.R., Mohamed, H., Abiola S., Babatunde, A.S., Jules-Roger Kuate, J.R., Noubissi, F.K., EL Sayed, K.A., Whitfield, G.K., Chamcheu, J.C., 2018. Anticancer properties of graviola (*Annona muricata*): a comprehensive mechanistic review. OMAS Cell. Long., 2018.

Silva, D.R., Rosalen, P.L., Freires, I.A., Sardi, J.C.O., Lima, R.F., Lazarini, J.G., Costa, T.K.V.L., Pereira, J.V., Godoy, G.P., Costa, E.M.M.B. *Anadenanthera Colubrina* vell Brenan: anti-*Candida* and antibiofilm activities, toxicity and therapeutical action. Braz. Oral Res., v.33, 2019.

Wall, G., Montelongo-Jauregui, D., Bonifacio, B. V., Lopez-Ribot, J. L., Uppuluri, P., 2019. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. Curr. Opin. Microbiol., 52, 1-6.

Yano, J., Fidel Jr, P. L., 2011). Protocols for vaginal inoculation and sample collection in the experimental mouse model of *Candida* vaginitis. JoVE (Journal of Visualized Experiments), 58, e3382.

Yano, J., Sobel, J. D., Nyirjesy, P., Sobel, R., Williams, V. L., Yu, Q., Fidel, P. L., 2019. Current patient perspectives of vulvovaginal candidiasis: incidence, symptoms, management and post-treatment outcomes. BMC women's health, 19(1), 1-9.

**Table 1** - Experimental groups of animals.

Experimental groups	<i>C. albicans</i> infection	Vehicle (DMSO 5% + 5% Tween 80)	Nystatin (25000 UI/g)	AME	Animals
Uninfected and untreated animals	-	-	-	-	6
Infected animals	+	-	-	-	6
Vehicle	+	+	-	-	6
AME 0.2 mg/mL	+	+	-	+	6
AME 1.0 mg/mL	+	+	-	+	6
Nystatin	+	-	+	-	6

**Table 2** - Extracellular components of the exopolysaccharide matrix of *C. albicans* biofilms treated with AME and Nystatin.

Sample	Carbohydrates ( $\mu\text{g/mL}$ )	Proteins ( $\mu\text{g/mL}$ )	eDNA ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ )
Control	1.49 $\pm$ 0.04	9.25 $\pm$ 0.11	43.9 $\pm$ 0.09
AME	0.94 $\pm$ 0.002 <sup>a</sup>	7.98 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	20.5 $\pm$ 0.1
Nystatin	0.85 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	8.23 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	34.7 $\pm$ 0.05

Control – growth control; AME – ethanolic extract of *A. muricata*; <sup>a</sup>Statistically different from growth control (ANOVA followed by Bonferroni,  $P < 0.05$ ); <sup>b</sup>Statistically different from nystatin (ANOVA followed by Bonferroni,  $P < 0.05$ ). The experiments were performed in triplicate, and data are showed as mean  $\pm$  SD.

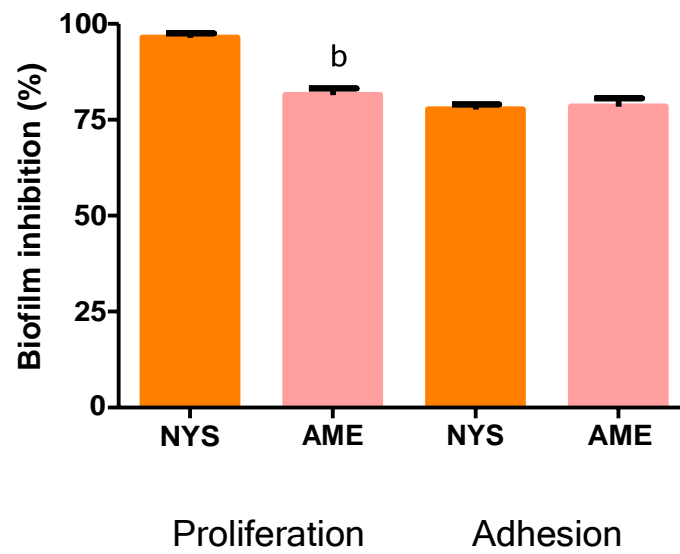
**Table 3** - Number of infected animals and quantification of fungal burden observed for animals treated intravaginally with different concentrations of AME and their respective controls.

Groups	Day 1		Day 3		Day 6		% of reduction <sup>a</sup>
	Infected animals/N %	Log CFU/mL $\pm$ SD	Infected animals /N %	Log CFU/mL $\pm$ SD	Infected animals /N %	Log CFU/mL $\pm$ SD	
<b>Infected control</b>	6/6	1.42 $\pm$ 0.13	6/6	1.98 $\pm$ 0.12	6/6	2.29 $\pm$ 0.10	0,0
<b>Vehicle</b>	6/6	1.72 $\pm$ 0.40	6/6	2.20 $\pm$ 0.28	6/6	2.65 $\pm$ 0.20	0.0
<b>AME 0.2 mg/mL</b>	6/6	1.87 $\pm$ 0.56	6/6	1.63 $\pm$ 0.45	6/6	1.50 $\pm$ 0.43	19.9
<b>AME 1.0 mg/mL</b>	6/6	1.49 $\pm$ 0.30	6/6	1.18 $\pm$ 0.27	2/6	0.60 $\pm$ 0.55*	59.7**
<b>Nystatin</b>	6/6	2.05 $\pm$ 0.56	0/6	0.00 $\pm$ 0.00	0/6	0.00 $\pm$ 0,00*	100**

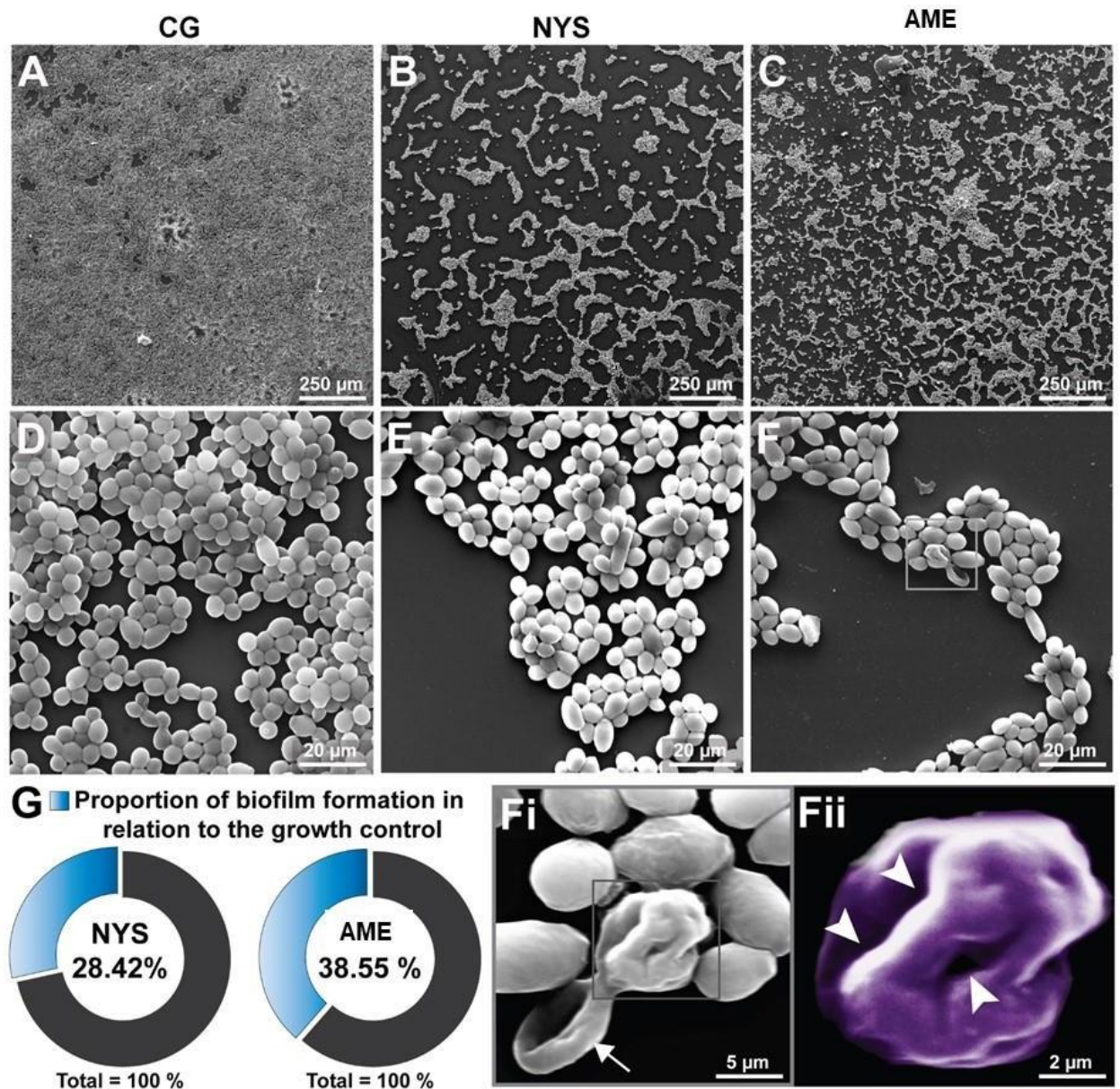
<sup>a</sup> = Percentage of fungal load reduction compared to the first day of treatment;

\* Statistically significant difference compared to the values obtained on day 0 ( $p < 0.05$ );

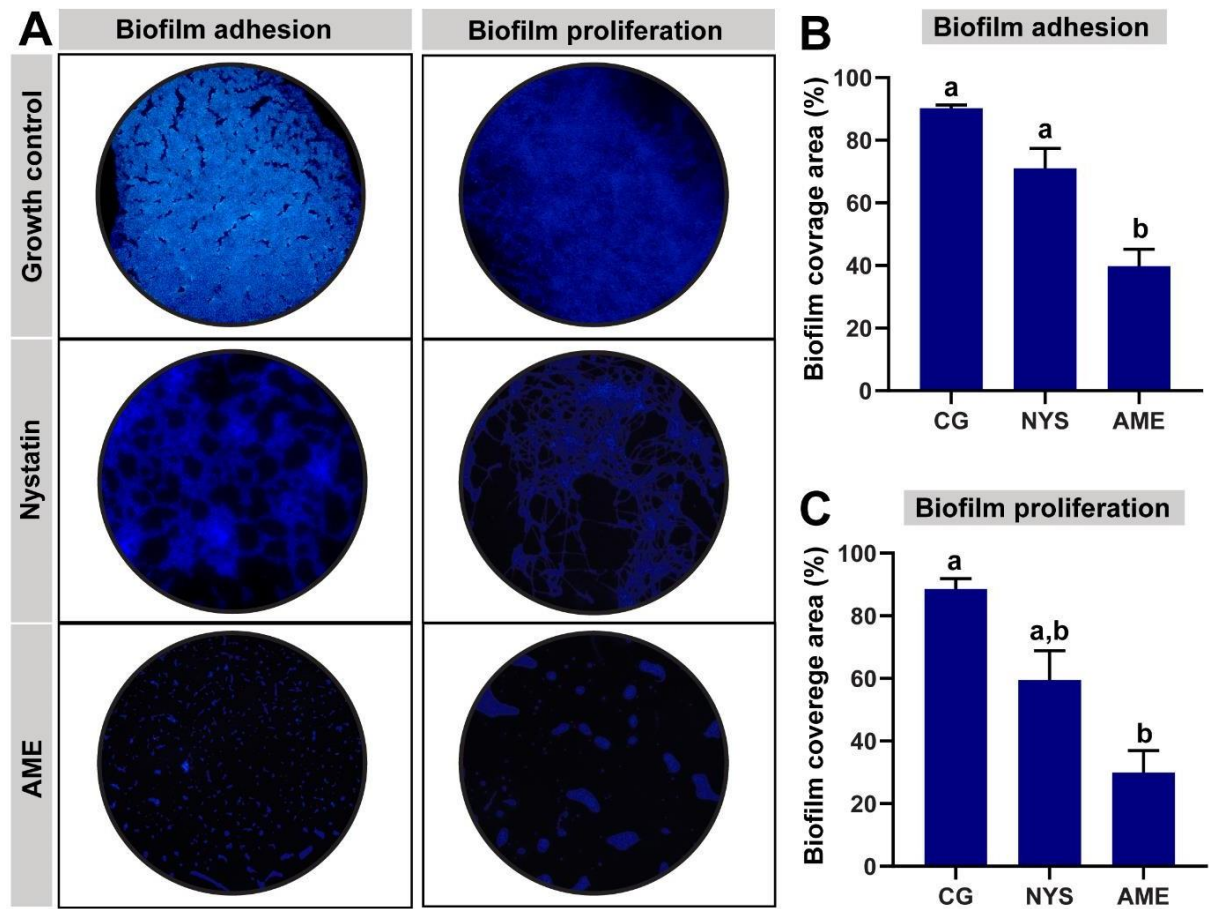
\*\* Statistically significant reduction compared to the values obtained in the infected control ( $p < 0.05$ ).



**Figure 1** - Effects of nystatin (NYS) and AME on the established and adherence of *C. albicans* biofilms by spectrophotometric analyses. The letter indicates statistically significant difference in relation to NY (b). (ANOVA followed by Bonferroni,  $P < 0.05$ ). Tests were performed in triplicate and data represent mean  $\pm$  SD.

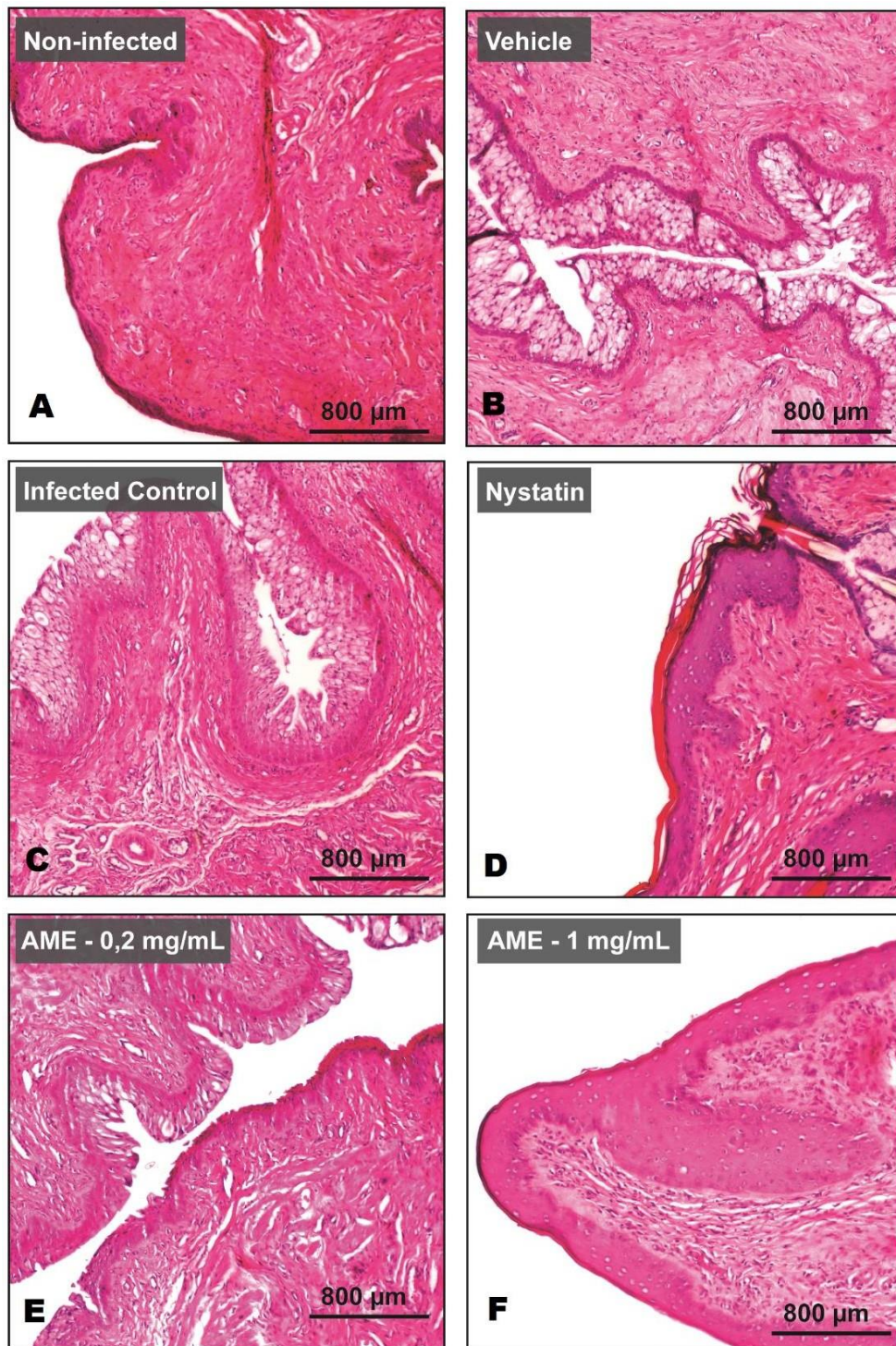


**Figure 2** - Biofilm scanning electron micrographs of *C. albicans* with or without *Annona muricata* extract (AME) treatment. In lower (A-C) and higher (D-F) magnifications observe biofilm formation without in growth control (CG; A, D) and after treatment with nystatin (NY; B, E) or AME (C, F). Note in details (Fi) degenerating cells presenting retraction (arrow) and increased cell envelope roughness (box, Fi) with the occurrence of cell wall pores (Fi, arrowheads). (G) shows the proportion of biofilm formation after treatment with nystatin or AME in relation with the growth control (100%). Cultures were treated or not with nystatin and AME for 24h and processed and analyzed by SEM. Quantitative analyses were done in Fiji software (National Institute of Health, EUA).



**Figure 3** - *C. albicans* biofilm formation and adhesion are inhibited by AME treatment. (A) Whole slide images (WSI) of biofilms growing on the surface of coverslips. The total area of the biofilm is shown under normal fungal growth conditions (growth control group/GC) and after nystatin (NYS) or AME treatments. (B) Proportion of biofilm adhesion or proliferation on coverslips was expressed as mean  $\pm$  SEM and the letter (a) indicate statistical difference (ANOVA followed by Bonferroni,  $P < 0.05$ ). (H) Proportion of the biofilm formation after treatment with NYS.





**Figure 4** - Photomicrographs of Hematoxylin and Eosin-stained longitudinal vaginal representative. (A) non-infected animals; (B) animals infected and have been treated with a vehicle; (C) animals infected but have not been treated (negative control); (D) animals infected treated with nystatin (positive control, 25000 UI/g); (E) animals infected and treated with AME 0.2 mg/mL; (F) animals infected and treated with AME 1,0 mg/mL. 200x magnification; 100mm scale bar.



**7 CAPÍTULO 3 – PATENTE REFERENTE A UMA FORMULAÇÃO A BASE DE CARBOPOL CONTENDO EXTRATO ETANÓLICO DE *A. muricata*, VISANDO O TRATAMENTO DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL**

**PATENTE**

**“PROCESSO DE OBTENÇÃO DE GEL PARA USO VAGINAL À BASE DE CARBOPOL COM *Annona muricata* L., COMPOSIÇÕES E USOS”**

**Submetido ao Centro Regional de Inovação e Transferência de Tecnologia (CRITT) para registro de depósito**

## 7.1 RESUMO DA PATENTE

A presente invenção propõe um processo de obtenção de uma formulação gelificada para uso vaginal a partir do extrato etanólico das partes aéreas de *Annona muricata* L. incorporado ao carbopol e suas composições e usos. Tanto a solução do extrato como sua formulação vaginal com carbopol pode ser utilizada como agentes antifúngicos no combate a candidíase vulvovaginal. A presença de carbopol contribui para dispersar os princípios ativos na mistura, além de induzir um mecanismo de liberação controlada dos componentes ativos do extrato, melhorar a biodisponibilidade, aumentar a estabilidade térmica dos componentes, potencializar e vetorizar o efeito antifúngico tópico.

## 7.2 REIVINDICAÇÕES DA PATENTE

1. COMPOSIÇÃO FITOTERÁPICA GELIFICADA, NA BASE DE *ANNONAMURICATA COM CARBOPOL* **caracterizada por** compreender: a) mistura de extrato etanólico de *Annona muricata* e carbopol; b) concentração de extrato etanólico na faixa de na proporção de 1,0%, 2,5% e 5,0% p/p; c) concentração de carbopol na faixa de 0,5% d) componentes do extrato e carbopol em proporção mássica extrato/carbopol de 1,0%:99,0% p/p, 2,5%:97,5% p/p e 5,0%:95,0% p/p.
2. COMPOSIÇÃO FITOTERÁPICA GELIFICADA, NA BASE DE *ANNONAMURICATA COM CARBOPOL* de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pela** mistura de carbopol a 0,5% p/v, 100 mL de água v/v, Aminometil propanol (AMP 95) qsp correção de pH (aproximadamente 5) e 1,0% ou 2,5% ou 5,0% de *Annona muricata*.
3. COMPOSIÇÃO FITOTERÁPICA GELIFICADA, NA BASE DE *ANNONAMURICATA COM CARBOPOL*, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por:** a) todas as concentrações apresentarem uma drástica redução na massa ( $\approx 90\%$ ) na faixa de temperatura de 30-150°C pela análise termogravimétrica; b) pelofato de com o aumento gradual da temperatura de mínimo bem como fluxo de calor, sugerem que o AME altera as interações polímero-polímero e polímero-solvente de forma não óbvia, induzindo o rompimento de uma quantidade gradualmente maior de interações intermoleculares à medida que sua concentração aumenta.

4. COMPOSIÇÃO FITOTERÁPICA GELIFICADA, NA BASE DE *ANNONAMURICATA* COM *CARBOPOL*, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por:** a) todas as amostras apresentarem comportamento do tipo sólido, uma vez que  $G' > G''$  em uma ampla faixa de tensão de cisalhamento; b) o extrato contribui para o enfraquecimento das interações intermoleculares tridimensionais polímero-polímero provavelmente devido à neutralização da macromolécula aniônica pelos íons presentes no extrato de AME, o que por sua vez é um facilitador para a espalhabilidade do material; c) pelo fato de que o gel 0.0% e 1.0% sofre uma lenta redução na viscosidade, atribuída à redução do atrito interno como consequência do aumento da energia cinética molecular e desdobramento macromolecular. A adição de 2,5% e 5,0% provoca mudanças importantes no comportamento dos géis com a temperatura, uma vez que se observa um aumento da viscosidade; d) com a concentração crescente de AME, há redução gradual do módulo de elasticidade e de armazenamento, tempos de relaxamento, tempos de retardação, e frequências de toque.
5. COMPOSIÇÃO FITOTERÁPICA GELIFICADA, NA BASE DE *ANNONAMURICATA* COM *CARBOPOL*, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por:** redução da impedância com a concentração de AME (o meio torna-se mais condutivo), porém de forma não linear; demonstrando que a ausência de linearidade é um efeito não óbvio, indicativo de ausência de efeito aditivo que corrobora a hipótese de neutralização das macromoléculas pelos componentes iônicos do extrato até a concentração próxima de 2,5%, a partir do qual os valores de impedância sofrem brusca atenuação por saturação dos grupos iônicos das macromoléculas
6. COMPOSIÇÃO FITOTERÁPICA GELIFICADA, NA BASE DE *ANNONAMURICATA* COM *CARBOPOL*, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pela** solubilização de 0,5 gramas de carbopol em 100 mL de solução de água (p/v). Agitação constante em agitador magnético. Aminometil propanol (AMP 95), até alcançar o pH de 5. Homogeneização do extrato (em 1,0%, 2,5% ou 5,0%). O procedimento de incorporação foi realizado utilizando o padrão p/p de AME:carbopol-gel.
7. COMPOSIÇÃO FITOTERÁPICA SEMISSÓLIDA, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** apresentar extrato etanólico de *Annona muricata* obtido a partir das partes aéreas da planta.

8. COMPOSIÇÃO FITOTERÁPICA SEMISSÓLIDA, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** carbopol e componentes do extrato se encontrarem na forma de uma formulação gelificada previamente preparada.
9. COMPOSIÇÃO FITOTERÁPICA SEMISSÓLIDA, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pela** formulação gelificada carbopol/extrato apresentarem maior estabilidade térmica se comparado ao extrato puro.
10. COMPOSIÇÃO FITOTERÁPICA SEMISSÓLIDA, de acordo com as reivindicações 2-5, **caracterizada pela** formulação gelificada formada entre o carbopol e componentes do extrato se encontrarem na forma de géis.
11. COMPOSIÇÃO FITOTERÁPICA SEMISSÓLIDA, de acordo com as reivindicações 1-9, **caracterizados pela** formulação gelificada atuar como dispositivo de liberação controlada dos componentes do extrato.
12. USO DE COMPOSIÇÃO FITOTERÁPICA SEMISSÓLIDA COMO ANTIFÚNGICO TÓPICO, formulada de acordo com as reivindicações 1-10, **caracterizada por** apresentar atividade contra *Candida albicans*.
13. COMPOSIÇÃO FITOTERÁPICA SEMISSÓLIDA, de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizada por** ser uma formulação farmacêutica de candidíase vulvovaginal tópica.
14. USO DE COMPOSIÇÃO FITOTERÁPICA SEMISSÓLIDA COMO ANTIFÚNGICO TÓPICO, formulada de acordo com as reivindicações 1-12 **caracterizada por** atuar de forma mucoadesiva, favorecendo a difusão dos agentes ativos através do epitélio.
15. USO DE COMPOSIÇÃO FITOTERÁPICA SEMISSÓLIDA COMO ANTIFÚNGICO TÓPICO, formulada de acordo com as reivindicações 1-13, **caracterizada por** apresentar uma resposta antifúngica rápida, a partir do terceiro dia de tratamento.

### 7.3 RELATÓRIO DA PATENTE

#### **“PROCESSO DE OBTENÇÃO DE GEL PARA USO VAGINAL À BASE DE CARBOPOL COM *ANNONA MURICATA* L., COMPOSIÇÕES E USOS”**

##### **CAMPO DE APLICAÇÃO**

Trata-se a presente invenção do processo de obtenção de um gel para uso vaginal a partir do extrato etanólico das folhas de *Annona muricata* L. incorporado a uma formulação que tem como base o carbopol, suas composições e usos. Tanto a solução do extrato como sua formulação vaginal com carbopol podem ser utilizadas como agentes antifúngicos no combate a candidíase vulvovaginal. A presença de carbopol confere a base gelificada da formulação, contribuindo para dispersar os princípios ativos na mistura, além de atribuir mucoadesividade no epitélio vaginal, melhorando a biodisponibilidade, aumenta a estabilidade térmica dos componentes, potencializa e vetoriza o efeito antifúngico tópico.

##### **ESTUDO DA TÉCNICA**

[02] *A. muricata* L. popularmente conhecida como graviola é uma planta distribuída em áreas da América Central e do Sul, África e sudeste Ásia (Chana et al., J. Pharm. Pharmacol., v.72, 2019; Nugraha et al., Molecules, v.24, 2019).

[03] Os compostos de grande prevalência em *A. muricata* são as acetogeninas (AGEs) anonáceas. As AGEs são uma classe única de metabólitos secundários derivados de ácidos graxos de cadeia longa da via dos policetídeos. Caracterizam-se geralmente por uma combinação de ácidos graxos com uma unidade de 2-propanol no C-2 que forma um grupamento substituído metil  $\alpha,\beta$ -insaturado  $\gamma$ -lactona (Abdul Wahab et al., Front. Pharmacol., v.9,2018).

[04] A literatura relata diversas atividades biológicas para as AGEs, incluindo atividades antimaláricas, antiparasitárias e pesticidas. Contudo, as atividades biológicas das AGE's são principalmente relacionadas à toxicidade contra as células cancerosas e efeitos inibidores contra o complexo mitocondrial. (Moghadamtous et al., Int. J. Mol. Sci., v.16, 2015). Ao longo dos anos alguns constituintes foram isolados, como anomuricina A, anomuricina B, anomuricina C, muricatocina A, muricatocina B

e muricatocina C (Wu et al., J. Nat. Prod., v.58, 1995a, b, c). Anopentocina A, anopentocina B, anopentocina C, cis-anomuricina-D-onas e trans-anomuricina-D-onas das folhas de *A. muricata* (Zeng et al., J. Nat. Prod., v.59, 1996). Anonacina, anonacina A, anonacina B, anonacina-10-ona, muricatalicina e muricatalina foram isoladas e identificadas (Yu et al., 1997).

[05] Diversos estudos apontam que as folhas de *A. muricata* são uma importante fonte de flavonoides. Geralmente, os flavonoides encontrados nas folhas de *A. muricata* estão sob a forma glicosilada. Esses compostos possuem ação antioxidante, combatendo radicais livres, propriedades que são conferidas pelos grupos fenólicos OH, e as duplas ligações presentes na sua estrutura química fundamental (Manrique-de-La-Cuba et al., J. Mol. Model., v.25, 2019). Na literatura encontramos a rutina, campferol-3-O-rutinosídeo e campferol-3-O-robinobiosídeo como os flavonoides mais encontrados (Yang et al., Carcinogenesis, v. 36, 2015).

[06] Fofana et al. (Chem. Nat. Compod., v.48, 2012) realizou uma investigação mais aprofundada sobre o conteúdo de alcalóides das folhas de *A. muricata* usando cromatografia em coluna de sílica gel. A reticulina e a cureximina são os alcaloides mais abundantes em *A. muricata* (Leboeuf et al., J. Nat. Prod., v.45, 1982), e as folhas continham a maior concentração de alcaloides em comparação com as raízes, caules e frutos (FOFANA et al., Chem. Nat. Compod., v.48, 2012).

[07] *A. muricata* tornou-se um tema interessante na procura de novos agentes terapêuticos. Estudos recentes realizados por Pinto e colaboradores (Ind. Crop. Prod., v.107, 2017) investigaram a ação antibacteriana do extrato metanólico de folhas de *A. muricata*. O extrato foi testado contra várias cepas de bactérias, sendo ativa contra bactérias gram-negativas e gram-positivas, ressaltando uma maior atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* e *Enterococcus faecalis*.

[08] O Brasil conta com a RDC nº 26/2014, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e diz respeito aos fitoterápicos que são regulamentados como medicamentos usados para diagnóstico, cura, tratamento e prevenção de doenças ou melhora na qualidade de vida. Esta resolução estabelece que o medicamento fitoterápico é aquele obtido com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e eficácia sejam baseadas em evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade.

[09] Medicamentos sintéticos e fitoterápicos são regulamentados e tratados, de acordo com a legislação brasileira, com o mesmo rigor, mesmo com a facilidade

de obtenção dos extratos. É necessário para a manutenção da segurança e eficácia de uma forma farmacêutica, garantir a estabilidade química dos componentes, considerando a correlação entre a atividade biológica e a composição química do extrato vegetal.

[10] Nesse sentido, várias abordagens têm sido descritas, visando a descoberta de tecnologias que agreguem vantagens físico-químicas e biológicas aos componentes dos extratos, levando conseqüentemente, a melhora dos resultados terapêuticos. Tais estratégias incluem, por exemplo, o emprego dos sistemas mucoadesivos. O uso dessas tecnologias tem como objetivo melhorar a solubilidade do produto em meio aquoso, a biodisponibilidade dos compostos ativos através do aumento da estabilidade química, vetorização das substâncias nos órgãos alvos, protegendo contra fixação em tecidos e órgãos indesejados, o que tende a reduzir efeitos tóxicos, além de contribuir para redução dos custos de produção.

[11] A formulação com sistemas de entrega de drogas frequentemente utiliza o carbopol para criar géis biocompatíveis. Homopolímeros de alto peso molecular de ácido acrílico chamados polímeros de carbopol (também conhecidos como resinas carbômeras) são reticulados intramolecularmente por poliéteres (Shafiei et al., *Polymer*, v.139, 2018). Assemelham-se a um pó branco constituído por partículas microscópicas enquanto estão secos, mas quando são dispersos em água, ocorre um pequeno desenrolamento das moléculas. Devido à atração eletrostática entre os grupos de ácidos carboxílicos pendentes carregados negativamente, a neutralização com uma base adequada causa um desenrolamento adicional maior, que por sua vez causa uma extensão significativa das cadeias poliméricas (Graziano et al., *J. Colloid Interface Sci.*, v. 15, 2021; US 202110069105 A1; US 20200121624 A1; US 20100284943 A1; US 20180311358 A1; US 20160015813 A1; US 20150072012 A1; US 20130096189 A1; 20100303940 A1; US 20100284943 A1; 20080152713 A1; US 6342254 B1).

[12] Embora haja várias composições contendo extratos de plantas ou produtos de origem vegetal citados no estado da técnica com diversas finalidades, até o presente momento não se encontra, nas principais bases de dados de patentes, nenhuma tecnologia que descrevesse ou reivindicasse produtos, processos ou o uso da espécie *A. muricata* em combinação com carbopol, para quaisquer aplicações objeto da presente invenção.

[13] Foi realizada uma busca na base de dados USPTO (<http://patft.uspto.gov/netahtml/PTO/search-bool.html>), utilizando as palavras-chave “carbopol” AND “*Annona muricata*”. Com base nesta busca, foram encontradas 14 patentes, onde espécies de *Annona* foram citadas, dentre elas *Annona muricata*. No entanto, *Annona squamosa* é a espécie que teve maior reivindicação, sendo que nenhuma delas se tratava de uma formulação vaginal a base de carbopol e *A. muricata*. A pesquisa por “carbopol” AND “*Annona*” recuperou 42 resultados, sendo filtrado em 21 famílias, dentre elas apenas 1 reivindicou uma formulação vaginal a base de carbopol e *A. squamosa* (US 20080152713 A1). Pesquisas similares foram realizadas no WIPO, obtendo as mesmas 14 patentes recuperadas utilizando as palavras-chave “carbopol” AND “*Annona muricata*”, sem recuperar documentos que reivindicassem o uso da espécie *A. muricata* em formulações mucoadesivas contendo carbopol ou seus derivados. Uma busca feita no banco de dados INPI com a palavra aproximada: 'ANNONA no Título' recuperou 11 processos, sendo 3 se tratando de formulações com a espécie *A. muricata* em bases distintas do carbopol, mostrando que até o presente momento trata-se de um trabalho de caráter inovador.

[14] O uso de componentes químicos, tanto sintéticos como de origem natural, para o tratamento de determinadas patologias, requer, muitas vezes, a incorporação desses compostos em formulações, afim de que possam permitir a veiculação. Isso porque tais compostos geralmente encontram-se num estado físico não apropriado para a aplicação. Por exemplo, se determinadas substâncias estiverem no estado sólido ou num estado de elevada viscoelasticidade (quase sólidos), torna-se inviável a veiculação em determinadas partes do organismo, como a região vaginal. Além disso, para o usuário, é praticamente impossível o controle da concentração. Daí a necessidade de se incorporar espécies químicas biologicamente ativas em formulações.

[15] Além disso, se a formulação obtida for capaz de atuar de forma mucoadesiva, é possível a obtenção de formulação, com propriedades não óbvias se comparado ao uso dos componentes puros, especialmente se tais componentes interagirem com a composição. Quando as interações ocorrem entre princípio ativo e matriz, é possível ainda que a formulação como um todo atue como dispositivo de liberação controlada do princípio ativo, favorecendo sua penetração no tecido e minimizando sua degradação no meio biológico.



[16] Sendo assim, a matéria tratada refere-se ao processo de obtenção de formulação gelificada a base carbopol para uso vaginal a partir do extrato etanólico das partes aéreas de *Annona muricata* L., suas composições e usos (CESJ 46006).

## **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

[17] A presente invenção consiste em duas etapas principais (I e II) para se obter o produto final.

[18] A etapa I fundamenta-se na obtenção do extrato etanólico das folhas de *A. muricata* (AME). Para isso, coletou-se o material vegetal, o qual foi submetido a secagem em estufa à temperatura de 40 °C por 48 horas. Em seguida, as folhas foram pulverizadas em moinho de facas com malha MESH 20 até se obter um pó de granulometria 0,84 mm, obtendo uma massa de 6,5 gramas. Logo após, procedeu-se a extração por maceração estática utilizando etanol como fase líquida, à temperatura ambiente durante 5 dias. A cada 48 horas, substitui-se por igual volume de solvente para proceder a remaceração. Para a obtenção do extrato etanólico bruto coletou-se todas as frações líquidas filtradas e levou-as a um evaporador rotatório, à pressão reduzida, para retirada do solvente e, conseqüentemente, concentração do extrato.

[19] A etapa II, referente ao preparo o gel de carbopol 0,5%, e suas diferentes proporções de AME (1,0%, 2,5% e 5,0% de AME) constituiu inicialmente na solubilização de 0,5 gramas de carbopol em 100 mL de água (p/v). O sistema foi mantido em repouso *overnight*. Posteriormente, iniciou-se a agitação constante até a obtenção de gel. A partir desde procedimento básico, foi obtido a formulação gelificada, que foi utilizada para incorporação do extrato e para as análises do padrão “branco”. Para a formulação contendo as diferentes concentrações de AME, foi necessário a homogeneização do extrato (em 1,0%, 2,5% ou 5,0%). O procedimento de incorporação foi realizado utilizando o padrão p/p de AME:carbopol-gel, obtendo assim as concentrações de 1,0%, 2,5% e 5,0%.

[20] A presente tecnologia pode ser melhor compreendida através dos seguintes exemplos, não limitantes.

## **EXEMPLO 1: ANÁLISES TERMOGRAVIMÉTRICAS (TGA) E DIFERENCIAIS EXPLORATÓRIAS (DTA)**

[21] Análise térmica diferencial (DTA) e análise termogravimétrica (TGA) foram realizadas utilizando o módulo TGA/DTA STA7200RV da HITACHI. Os dados foram registrados para formulações contendo 0,0, 1,0, 2,5 e 5,0% p/p. Os experimentos foram realizados utilizando uma atmosfera dinâmica de ar de 300 mL/min, taxa de aquecimento de 20 °C/min com sensibilidade de 1°C. Para cada experimento utilizou-se aproximadamente 2 mg de amostra, que foi colocada em panelas abertas de alumina.

[22] TGA e DTA representam importantes ferramentas analíticas para investigar o perfil térmico de materiais complexos. As Figuras 1A e 1B mostram as curvas de TGA e DTA para carbopol e as respectivas formulações (Carb+AME 1,0%, Carb+AME 2,5% e Carb+AME 5,0%) obtidas em atmosfera dinâmica de ar, na faixa de 25 a 1000°C.

[23] Os dados de TGA para todas as amostras mostraram uma drástica redução na massa ( $\approx 90\%$ ) na faixa de temperatura de 30-150°C, que foi atribuída como a secagem de géis, uma vez que as amostras são constituídas principalmente por água. Nas curvas DTA, também foram observados na mesma faixa de temperatura picos endotérmicos, mas com posição do ponto mínimo e intensidade aumentando com a concentração de AME. Considerando que esta faixa de temperatura é característica de processos de desidratação e dessorção, com menor tendência de degradação de compostos, este aumento gradual da temperatura de mínimo bem como fluxo de calor sugerem que o AME está afetando as interações polímero-polímero e polímero-solvente de forma não óbvia, induzindo o rompimento de uma quantidade gradualmente maior de interações intermoleculares à medida que sua concentração aumenta.

[24] Após  $\approx 200^\circ\text{C}$  as curvas TGA e DTA apresentam um perfil mais atenuado de perda de massa, o que foi atribuído à degradação do carbopol e AME.

## **EXEMPLO 2: CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA DOS GEIS**

[25] Caracterizações reológicas foram realizadas para investigar as interações intermoleculares entre Carbopol e extrato de AME. As amostras, nas concentrações de 0,0, 1,0, 2,5 e 5,0% p/p, foram submetidas a ensaios reológicos oscilatórios e em modo transiente, utilizando um Reômetro Dinâmico Híbrido (DHR1; T.A. Instruments®), com geometria de placas paralelas (aço inoxidável, diâmetro 20,0 mm,

padrão DIN), acoplado a uma placa *peltier* para controle de temperatura. Os experimentos deste estudo foram obtidos com um valor de *gap* de 250  $\mu\text{m}$  e diferentes condições de temperatura conforme descrito abaixo.

[26] Os experimentos no modo oscilatório foram realizados da seguinte forma:

1) A amplitude de varredura oscilatória de deformação, de 0,5% a 500% no modo de varredura logarítmica, coletando 15 pontos por década e mantendo constante a frequência angular de 87,92 rad/s (14 Hz), foi realizada a 25°C para determinar a região de viscoelasticidade linear (LVE) e a possível ocorrência de uma tensão de escoamento ( $\tau_0$ ). 2) Após a determinação do limite máximo de deformação dos módulos viscoelásticos ( $G'$  e  $G''$ ), a amplitude de deformação foi fixada em 1% (mantida dentro do LVE) e a frequência de oscilação variou de 0,0 a 628 rad/s (0,0 a 100 Hz), em modo de varredura logarítmica, coletando 10 pontos por década, a 25°C.

3) Adicionalmente, experimentos de temperatura foram realizados em modo oscilatório, de 10 a 80°C a 10°C/min e mantendo constante a deformação de deformação ( $\gamma\% = 1\%$ ) e a frequência angular ( $\omega = 1 \text{ Hz}$  ou 6,28 rad/s).

[27] Experimentos em modo transiente foram realizados, a 25°C da seguinte forma: 1) Medições de fluência de curta duração, com aplicação de tensão de cisalhamento constante de 5 Pa, durante 30 s, foram realizadas para sondar as características viscoelásticas em função do tempo. As curvas de fluência versus tempo ( $J(t) \times t$ ) foram ajustadas usando o modelo de Jeffrey, uma vez que tal algoritmo é apropriado para determinar parâmetros viscoelásticos a partir de experimentos de deformação oscilante (*creep ringing*). Os ajustes foram realizados utilizando a ferramenta de ajuste não linear (NLFit) disponível no software ORIGIN PRO 9 (OriginLab Corporation). No software, o algoritmo de iteração de Levenberg-Marquardt foi aplicado (Goudoulas et al., J. Rheol., v.60, 2016).

[28] Cisalhamento oscilatório, varredura de frequência. Experimentos de cisalhamento oscilatório com varredura de amplitude foram empregados para verificar as propriedades viscoelásticas dos géis, em baixa deformação, quando a estrutura tridimensional supramolecular do material é mantida. Testes foram realizados para determinar as propriedades viscoelásticas dos géis, como módulo de armazenamento ( $G'$ ), módulo de perda ( $G''$ ).

[29] O módulo de armazenamento  $G'$  mede o componente elástico do material enquanto o módulo de perda  $G''$  mede a fluidez do material. Assim, quando  $G''$  é maior que  $G'$ , o material é mais fluido e quando  $G'$  é maior que  $G''$ , o material é mais sólido.

Como pode ser visto na Figura 2, todas as amostras têm principalmente comportamento do tipo sólido, uma vez que  $G' > G''$  em uma ampla faixa de tensão de cisalhamento.

[30] Além disso, a Figura 2A também mostra a existência de um cruzamento entre  $G'$  e  $G''$  que foi atribuído à existência de uma tensão de escoamento ( $\sigma_0$ ). Esta tensão de escoamento é a tensão limite que separa a “região viscoelástica linear” da “região viscoelástica não linear”. Após  $\tau_0$ , espera-se a ruptura da estrutura tridimensional intermolecular do fluido, com transição semelhante sólido-fluido (Boisly et al., Appl. Rheol., v.24, 2014; Ewoldt et al., Rheol. Acta, v.49, 2010). A Figura 2B mostra o fator de amortecimento contra a tensão de cisalhamento para avaliar a resultante do comportamento elástico e viscoso, uma vez que o fator de amortecimento descreve a razão das duas porções do comportamento viscoelástico:  $\tan(\theta) = G''/G'$ . Para todas as amostras, a transição de fase do tipo sólido-líquido pode ser observada em  $\tan(\theta) = 1$  (onde  $G'' = G'$ ). Para  $\tan(\theta) < 1$ , o comportamento do tipo sólido é observado enquanto o comportamento do tipo líquido é observado em  $\tan(\theta) > 1$ .

[31] A inserção na Figura 2A também mostra que a magnitude de  $\tau_0$  reduz com a concentração de AME, o que representa um efeito não óbvio de interação entre o AME e a matriz polimérica. Esses dados indicam que o AME contribui para o enfraquecimento das interações intermoleculares tridimensionais polímero-polímero provavelmente devido à neutralização da macromolécula aniônica pelos íons presentes no extrato de AME, o que por sua vez é um facilitador para a espalhabilidade do material.

[32] Cisalhamento oscilatório, varredura de frequência. A Figura 3A-B mostram os experimentos de varredura de frequência, onde o módulo  $G'$  e  $G''$  e a viscosidade complexa ( $\eta^*$ ) são plotados em relação à frequência. Para os fluidos, o módulo de elasticidade  $G'$  é praticamente independente da frequência, devido à existência de material fortemente estruturado, característico de um gel (Stadler, Korea Aust. Rheol. J., v.23, 2011). Consequentemente, somente em altas frequências há uma tendência de cruzamento das curvas, sugerindo transição sólido-líquido induzida pela oscilação de frequência. Além disso, como a viscosidade complexa diminui com a frequência, tem-se um comportamento pseudoplástico (Figura 3B). A dependência dos valores de  $\eta^*$  com a concentração de AME pode ser semelhante à dependência de  $\tau_0$  com a concentração, conforme descrito no experimento de varredura de

amplitude, corroborando a hipótese sobre a neutralização de macromoléculas de carbopol pelos cátions presentes no extrato de AME, o que é um efeito não óbvio que representa uma vantagem em termos de facilidade de espalhabilidade do material.

[33] É importante destacar que a existência de tensão de escoamento e tixotropia, embora sejam usualmente considerados fenômenos independentes, apresentam uma tendência a aparecer no mesmo fluido, pois acredita-se que sejam causados pela mesma física fundamental, pois a mesma microestrutura presente em um fluido que apresenta tensão de escoamento, quando quebrada por cisalhamento, seja a origem da tixotropia (Moller et al., *Soft Matter*, v.2, 2006).

[34] Cisalhamento oscilatório, rampa de temperatura. A Figura 4 mostra a dependência da temperatura da viscosidade complexa no aquecimento dos géis onde pode ser visto que o comportamento com a temperatura é diferente para cada amostra, sendo este, mais um efeito não óbvio resultante da interação entre os componentes.

[35] Para o Carbopol puro, observa-se uma baixa dependência de  $\eta^*$  com a temperatura até  $\approx 60$  °C. Após esta temperatura, a amostra sofre uma lenta redução na viscosidade, atribuída à redução do atrito interno como consequência do aumentada energia cinética molecular e desdobramento macromolecular.

[36] A adição de 1,0% de AME causa uma redução abrupta de  $\eta^*$ , semelhante ao descrito acima em experimentos de varredura de frequência e amplitude. No entanto, este é o único sistema que  $\eta^*$  reduz continuamente com a temperatura dentro da faixa verificada. A adição de 2,5% e 5,0% provoca mudanças importantes no comportamento dos géis com a temperatura, uma vez que se observa um aumento da viscosidade.

[37] Uma possível explicação para esses comportamentos é o fato de que para essas duas últimas composições, como são muito mais fluidas em decorrência da quebra prévia das interações intermoleculares, elas podem perder moléculas de água com mais facilidade, gerando maior atrito interno com consequente aumentada viscosidade em altas temperaturas. Por outro lado, as amostras de Carbopol puro e Carb+AME 1,0%, como possuem baixo grau de neutralização macromolecular, espera-se um maior grau de interação água-macromolécula, com menor taxa de desidratação com a temperatura.

[38] Experimento de fluência em curto intervalo de tempo. O acoplamento

entre a inércia do reômetro e a elasticidade superficial de um determinado fluido em um instrumento de tensão controlada (como é o caso do DHR 1 da T.A. instruments), gera uma resposta muito particular em sua fluência, de modo que a propriedade complacência ( $J(t) / \text{Pa}^{-1}$ ; que mede a fluência temporal do material), quando medida em curta escala de tempo (da ordem de  $\approx 10^{-3}$  a  $\approx 100$  s), sofre uma oscilação amortecida até alcançar o estado estacionário de fluidez. Tal comportamento é conhecido como “oscilação amortecida” (creep ringing) (Goudoulas et al., J. Rheol., v.60, 2016).

[39] Para fluidos viscoelásticos, é muito útil observar o comportamento do amortecimento oscilante da fluência, em curta escala de tempo, onde os efeitos de inércia são dominantes, pois pode revelar interessantes propriedades relativas à dinâmica molecular envolvida nos processos de relaxação (Figura 5).

[40] A Figura 5 mostra os dados de fluência, onde a propriedade complacência, medida a 5 Pa durante 30 s, é plotada em relação ao tempo para as quatro amostras. Os dados foram ajustados pelo uso do modelo mecanicístico conhecido como “modelo de Jeffrey”, que consiste em uma mola e um amortecedor em paralelo (elemento Kelvin-Voigt) em série com um amortecedor e a inércia do instrumento, que é a fonte para a fluência com oscilação amortecida (creep ringing). Detalhes teóricos sobre a equação “creep ringing” podem ser encontrados no artigo de Goudoulas et al., (2016) (Goudoulas et al., J. Rheol., v.60, 2016).

[41] De acordo com o modelo de Jeffreys, os seguintes parâmetros viscoelásticos foram calculados (Figura 6): Módulo de elasticidade ( $G / \text{Pa}$ ), tempo de relaxamento ( $\lambda_1 / \text{s}$ ), tempo de retardo ( $\lambda_2 / \text{s}$ ), viscosidade de Jeffrey ( $\eta_1 / \text{Pa.s}$ ), viscosidade de Kelvin-Voigt ( $\eta_2 / \text{Pa.s}$ ), Módulo de Armazenamento ( $G' / \text{Pa}$ ), Módulo de Perda ( $G'' / \text{Pa}$ ) e a frequência de oscilação ( $\omega t / \text{rad/s}$ ). O significado de cada um dos parâmetros também é dado na Figura 6.

[42] Semelhante ao observado nos demais experimentos reológicos descritos acima, a adição de AME na amostra causou mudanças drásticas na resposta viscoelástica dos géis nos experimentos de fluência. Conforme observado na Figura 6, a concentração crescente de AME causou redução gradual do módulo de elasticidade e de armazenamento, tempos de relaxamento, tempos de retardação, e frequências de toque.

[43] O carbopol puro apresentou menor complacência, menor amplitude de

oscilação e um estado estacionário linear de complacência após o período de oscilação, o que foi atribuído à sua maior elasticidade. A adição de AME causou aumento gradual na complacência, na amplitude de oscilação, causando distorção da complacência após o período de oscilação (o estado estacionário foi cada vez menos linear após o período de oscilação). Como pode ser visto, a convergência em estado estacionário é gradualmente menor com o aumento da concentração de AME, o que foi atribuído ao aumento da componente viscosa da viscoelasticidade. Além disso, a amplitude da oscilação é gradativamente maior à medida que a concentração de AME aumenta, devido à maior turbulência molecular e maior capacidade de dissipar energia mecânica.

[44] A 5% da AME, observa-se uma situação extrema, com complacência não linear, que aumenta com o tempo. Esse comportamento pode ser atribuído a uma ruptura contínua e irreversível da estrutura do fluido, devido à presença de interações fracas, mostrando que quanto maior a concentração de AME, maior é a espalhabilidade da amostra.

### **EXEMPLO 3: IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *Annona muricata* L. POR UPLC-MS-Q-TOF.**

[45] O extrato etanólico de *A. muricata* foi analisado por cromatografia líquida ultrarrápida acoplada a espectrometria de massa (UFLC-MS) no modo positivo  $[M + H]^+$  usando um Shimadzu UFLC (modelo Nexera) e um espectrômetro de massa Bruker (modelo QTOF Compact) com fonte de ionização por *electrospray*. A fase móvel utilizada foi água acidificada com fórmica, com pH = 3 (fase A) e metanol (fase B), o fluxo de injeção foi de 0,4 mL/min e o tempo de corrida foi de 12 min. A coluna usada foi a Kinetex 2,6  $\mu$ m - C18 - 100A, comprimento 100 mm X 3,0 mm. A execução cromatográfica começou com 40% da fase B no tempo de 0,01 min, atingindo até 70% de B no tempo de 8,20 min e 95% de B de 8,20 a 9,70 min, posteriormente a fase móvel voltou a 40% B no tempo de 10,20 min, seguindo até 11,50 min, a corrida terminou em 12 min.

[46] De acordo com o perfil cromatográfico do extrato realizado por UFLC-QTOF-MS, 14 compostos foram identificados por meio de comparação do perfil de fragmentação de massas com a literatura especializada. Os compostos são: anopentocina, anomuricina, anohexocina, lolilida, S-norcorydine, assimilobina, ácido

caféico, aterosperminina, xilopina, nornuciferina, kaempferol-3-O-rutinosídeo, xianomuricina, rutina e sacarose (Figura 7). Alguns dos compostos identificados são relatados como tendo propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes. De acordo com o descrito no estado da técnica, esses compostos têm a capacidade de neutralizar os radicais livres e a atividade anti-inflamatória devido à inibição da peroxidação lipídica, produção de MDA, enzimas de óxido nítrico sintase, fosfolipase e supressão de genes inflamatórios, que são os principais parâmetros do estresse oxidativo. Portanto, o presente extrato é constituído de uma mistura de substâncias com potencial anti-inflamatório e antifúngico.

#### **EXEMPLO 5: MODELO EXPERIMENTAL DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E AVALIAÇÃO DA CARGA FÚNGICA**

[47] Fêmeas Wistar (peso corporal 150-200 g) foram coletivamente alojadas em uma sala experimental por pelo menos 5 dias antes dos experimentos. Os animais foram mantidos na sala experimental do Laboratório de Farmacologia da UFSJ - Campus Centro Oeste, em conformidade com as diretrizes institucionais ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 12 horas ciclo claro/escuro). O protocolo experimental foi aprovado Comitê de Ética em Experimentação da Universidade Federal de São João Del-Rei (protocolo número 021/2021).

[48] Para obter uma resposta crônica e uma infecção homogênea, os animais foram imunossuprimidos pela administração de ciclofosfamida (CPA) (Genuxal®, Baxter), em duas doses de 50 mg/kg de p.c., por via intra-peritoneal (0,3 mL), no primeiro e terceiro dias. Foi administrado em cada animal ciproionato de estradiol (E.C.P®, Zoetis-Pfizer – 0,2 mg/animal, 0,2 mL), por via subcutânea, 1 vez ao dia, durante 3 dias, que antecederam a infecção.

[49] As ratas foram inoculadas intravaginalmente com 0,1 mL de *C. albicans* ( $5,0 \times 10^7$  fungo/mL), utilizando uma micropipeta com pontas descartáveis. Dois dias após a inoculação (dia 0) a carga vaginal de *C. albicans* foi avaliada por meio da coleta de fluido vaginal com 0,1 mL de solução salina, plaqueada em ágar Sabouraud dextrose e quantificada as colônias. A infecção foi considerada suficiente se uma contagem média para as lavagens vaginais de cada rato foi pelo menos  $10^3$  UFC/mL (Fernandes et al., Mycoses, 2018).



[50] Para investigar os efeitos de AME livre e incorporado ao gel de carbopol 0,5%, diferentes concentrações de extrato foram utilizadas. Foram utilizados 9 grupos com um n grupo = 6 de fêmeas Wistar, que foram randomicamente divididas: Grupo 1: controle não infectado; Grupo 2: controle de infecção, controle negativo; Grupo 3: infectado e tratado com gel de carbopol e incorporado a AME 1,0%; Grupo 4: infectado e tratado com gel de carbopol e incorporado a AME 2,5%; Grupo 5: infectados e tratados com veículo controle – gel de carbopol 0,5%; Grupo 6: infectados e tratados com veículo controle - 5% DMSO + 5% Tween 80 em água destilada; Grupo 7: infectados e tratados com AME – 0,2 mg/mL; Grupo 8: infectados e tratados com AME – 1,0 mg/mL; Grupo 9: infectado e tratado com creme de nistatina (NIS, controle positivo, 25000 UI/g de creme).

[51] Após a confirmação da infecção (primeiro dia), os tratamentos foram administrados aos animais infectados uma vez por dia durante seis dias. Nos dias três e seis do experimento, a carga vaginal de *C. albicans* foi avaliada para verificar a eficácia do tratamento. No dia sete, os animais foram sacrificados e as amostras de vagina e vulva foram coletado para análises histopatológicas.

[52] Após o estabelecimento da infecção, a atividade das amostras contendo AME (livre e incorporado ao gel de carbopol) e nistatina em animais infectados foi examinada (Figura 8). No 3º e 6º dia após o início do tratamento, o fluido vaginal foi novamente coletado para quantificação da carga fúngica. Foi observado que no grupo de animais infectados e não tratados, tratados apenas com veículo e com o gel branco, a carga fúngica aumentou, permanecendo alta durante o período completo de tratamento. No grupo tratado com AME 0,2 mg/mL a carga fúngica reduziu, porém cinco animais ainda permaneceram infectados ao final do tratamento. Em contraste, o grupo AME 1,0 mg/mL reduziu significamente a carga fúngica e apenas dois animais permaneceram infectados. Em relação ao tratamento com os géis de carbopol incorporados a diferentes concentrações de AME, no grupo tratado com AME 1,0 % todos os animais permaneceram infectados e satisfatoriamente, no tratamento com gel AME 2,5% a carga fúngica foi reduzida e 4 animais não se encontravam mais infectados ao final do tratamento. O tratamento com nistatina, usado como controle positivo, exerceu uma redução completa dos animais infectados ainda no dia 3.

[53] De acordo com os resultados apresentados acima, podemos observar que gel de carbopol a 0,5% (branco), não foi capaz de reduzir a infecção vulvovaginal fúngica, portanto é relevante a formulação gelificada para uso vaginal à base de

carbopol com *A. muricata* para se obter resultados satisfatórios. É válido ressaltar que os animais tratados com gel AME:carbopol 2,5% apresentou uma atividade antifúngica mais promissora, já que houve uma redução de 80% na carga de fúngica. O estudo com AME livre demonstrou que ratos infectados com *C. albicans* são capazes de reduzir mais de 60% da carga fúngica em seis dias de tratamento com extrato de AME na concentração mais alta (1,0 mg/mL). Sendo assim, a redução aumentada da carga fúngica encontrada na formulação pode ser atribuída à capacidade do gel de carbopol de promover uma adesão eficiente à mucosa vaginal, levando a uma entrega melhorada do extrato e, conseqüentemente, a um efeito antifúngico melhorado.

### EXEMPLO 6: ANÁLISES HISTOLÓGICAS

[54] As amostras foram fixadas em formol tamponado a 10,0%, cortadas longitudinalmente e processado para análise histológica (inclusão de parafina e secções de 5 µm). As secções foram coradas com hematoxilina e eosina (HE), para avaliar a resposta tecidual tanto à infecção fúngica quanto protocolos de tratamento.

[55] O grupo controle não infectado exibiu morfologia da mucosa vaginal normal e não apresentou sinais de inflamação (Figura 9A) enquanto o grupo controle infectado apresentou elevada inflamação da mucosa vaginal e vacuolização (Figura 9B). Os grupos tratados com géis de carbopol 1,0% e 2,5% apresentaram inflamação leve a moderada (Figuras 9C e D). Alterações degenerativas/morte celular foram evidentes em animais infectados tratados com gel branco (Figura 9E) e controle do veículo (Figura 9F), além de intensa vacuolização citoplasmática. Degeneração e morte celular de queratinócitos foram menos proeminentes nos animais tratados com AME (Figura 9G e H). AME 2,5% exibiu a morfologia que mais se aproximou de animais sem infecção, com as estruturais epiteliais mantidas (Figura 9H). Na maioria dos animais do grupo infectado tratado com nistatina encontravam-se aparentemente mais inflamação e em comparação com a infecção isolada, além de áreas de moderada hiperqueratose e hiperplasia (acantose) da mucosa (Figura 9I).

### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[56] **Figura 1:** A) Curvas TGA e B) Curvas DTA para Carbopol puro, Carbopol +AME 1,0%, Carbopol +AME 2,5% e Carbopol +AME 5,0%. Os experimentos foram realizados em atmosfera dinâmica de ar a 300 mL/min.

[57] **Figura 2:** Varredura oscilatória da amplitude de deformação, de 0,5% a 500% (em escala logarítmica). A) Módulos  $G'$  e  $G''$  plotados em função da tensão de cisalhamento oscilatória ( $\sigma$ ). B) Fator de amortecimento em função da tensão de cisalhamento oscilatória ( $\sigma$ ). Experimentos realizados a 87,92 rad/s (14 Hz) e 25 oC.

[58] **Figura 3:** Varredura oscilatória da frequência de deformação, de 0,0 a 628 rad/s (0,0 a 100 Hz, em escala logarítmica). A) Módulos  $G'$  e  $G''$  plotados em função da frequência de cisalhamento oscilatório ( $\omega$ / Hz). B) Viscosidade complexa em função da frequência de cisalhamento oscilatório ( $\omega$ / Hz). Experimentos realizados a 87,92 rad/s (14 Hz) e 25 oC.

[59] **Figura 4:** A) Dependência da temperatura de  $\eta^*$  no aquecimento para géis. Experimentos realizados em  $\gamma = 1\%$  e  $\omega = 1$  Hz.

[60] **Figura 5:** Curvas de fluência em curto intervalo de tempo (0 a 2 s) para as quatro amostras.

[61] **Figura 6:** Parâmetros viscoelásticos obtidos por ajuste de dados de *creep ringing* usando o modelo de Jeffreys.

[62] **Figura 7:** Dados de MS no modo (+)ESI e os resultados da identificação dos compostos bioativos no extrato etanólico de *Annona muricata* (AME).

[63] **Figura 8:** Número de animais infectados e quantificação da carga fúngica observada para animais tratados intravaginalmente com diferentes concentrações do gel e seus respectivos controles. \* Diferença estatisticamente significativa comparada aos valores obtidos no dia 0 ( $p < 0,05$ ); \*\*Redução estatisticamente significativa comparada aos valores obtidos no controle infectados ( $p < 0,05$ ); DP = desvio padrão; n/N = número de animais infectados/número de animais por grupo.

[64] **Figura 9:** Fotomicrografias representativas de seções longitudinais da vagina coradas com hematoxilina e eosina. (A) Animais não infectados; (B) Animais não tratados infectados (controle negativo); (C) Animais infectados e tratados com gel 1,0%; (D) Animais infectados tratados com gel 2,5%; (E) Animais infectados e tratados com gel branco; (F) Animais infectados e tratados com veículo; (G) Animais infectados e tratados com AME 0,2 mg/mL; (H) Animais infectados e tratados com AME 1,0 mg/mL; (I) Animais infectados e tratados com nistatina (controle positivo, 25.000 UI/g); Ampliação 200  $\times$ . Barra de escala, 100  $\mu\text{m}$ .

## 7.4 RESULTADOS DA PATENTE

Figura 1 -

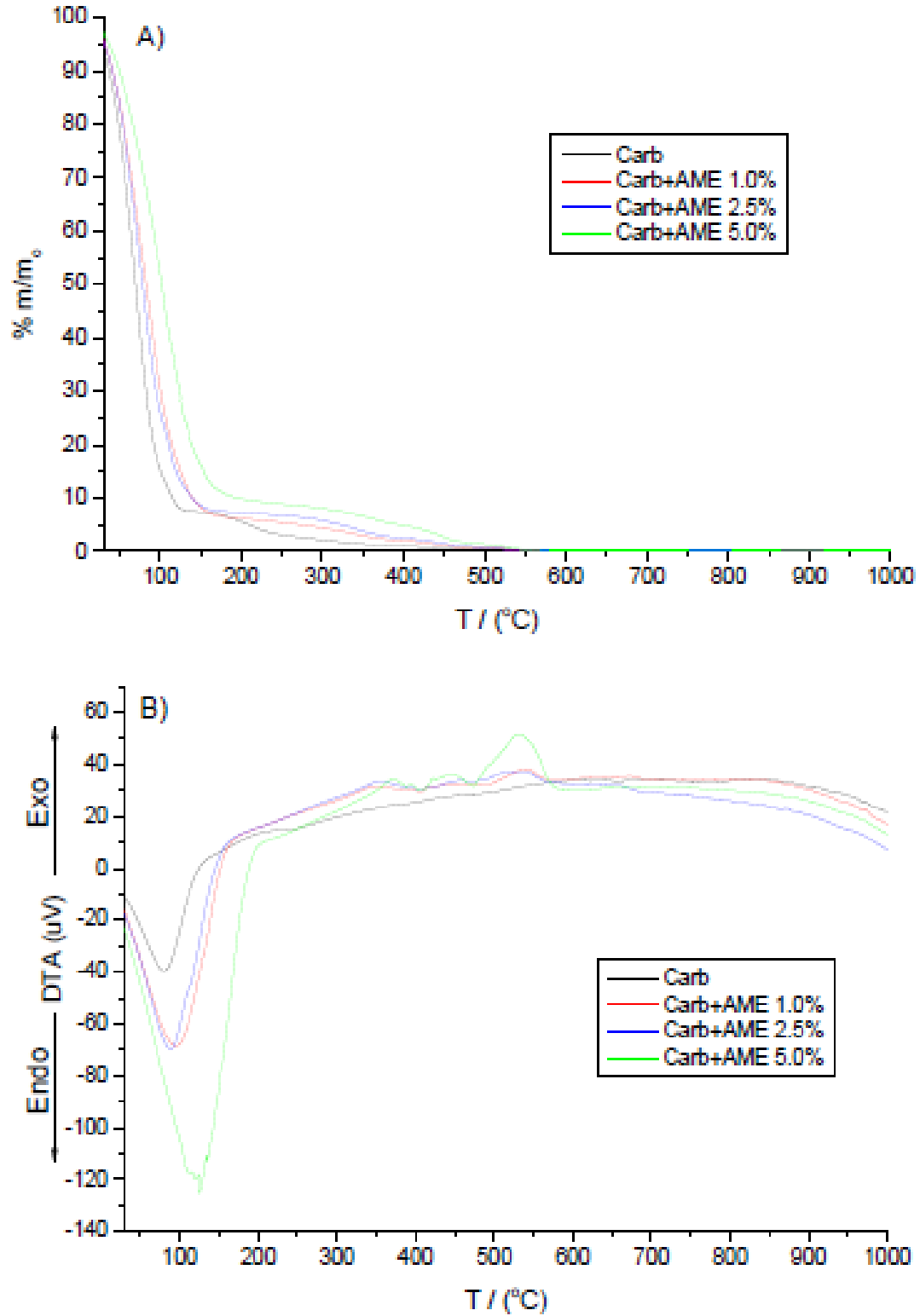


Figura 2 -

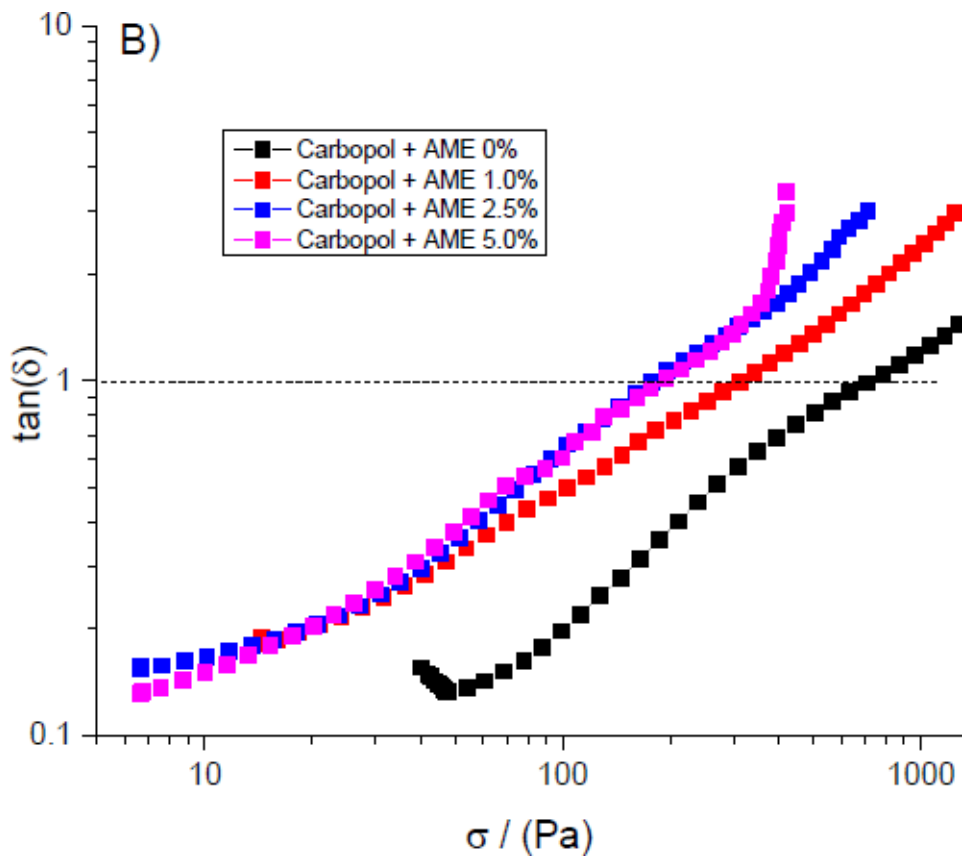
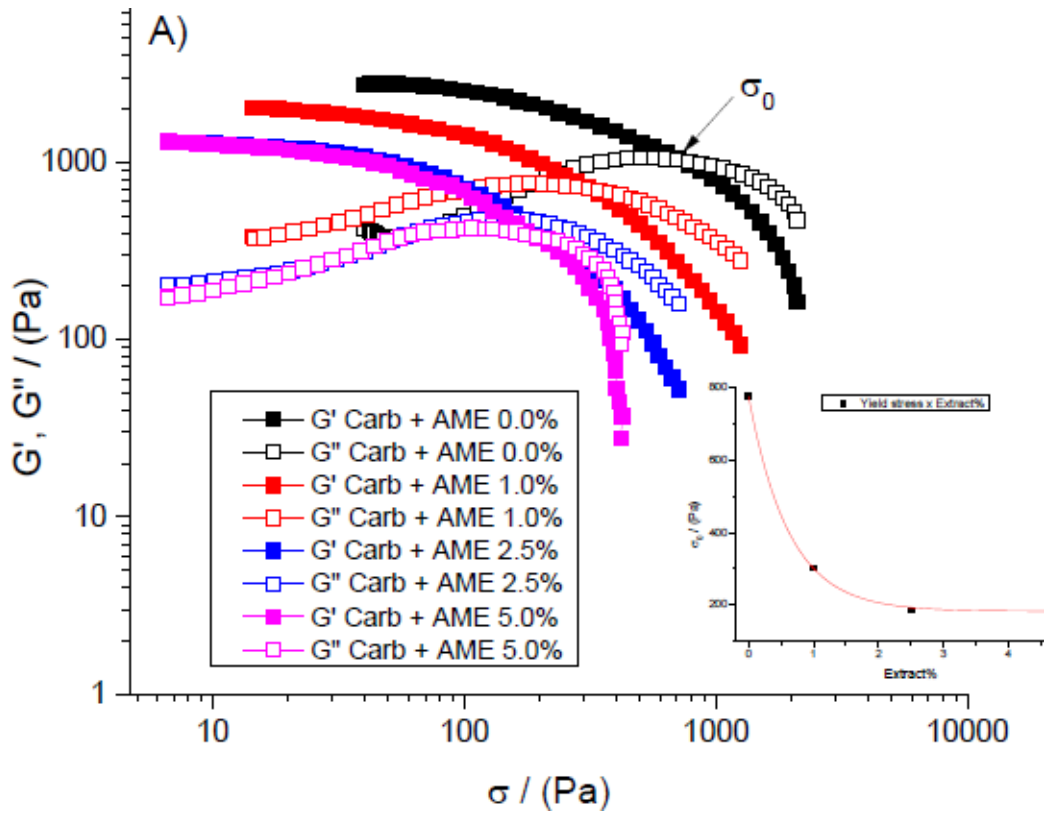


Figura 3 -

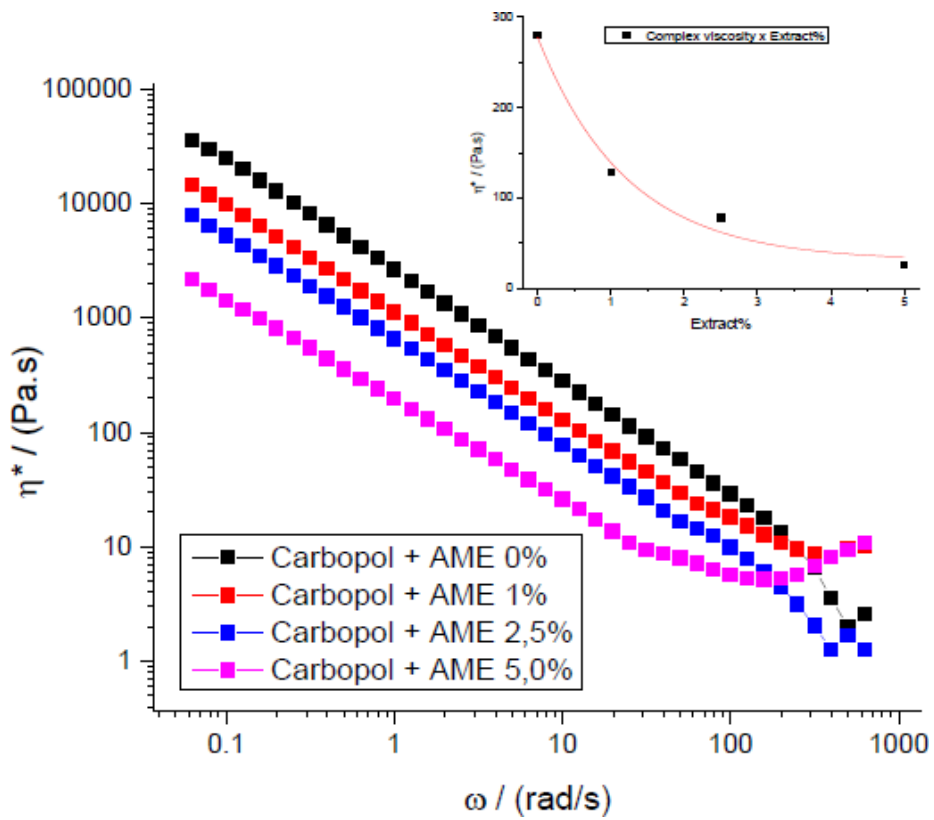
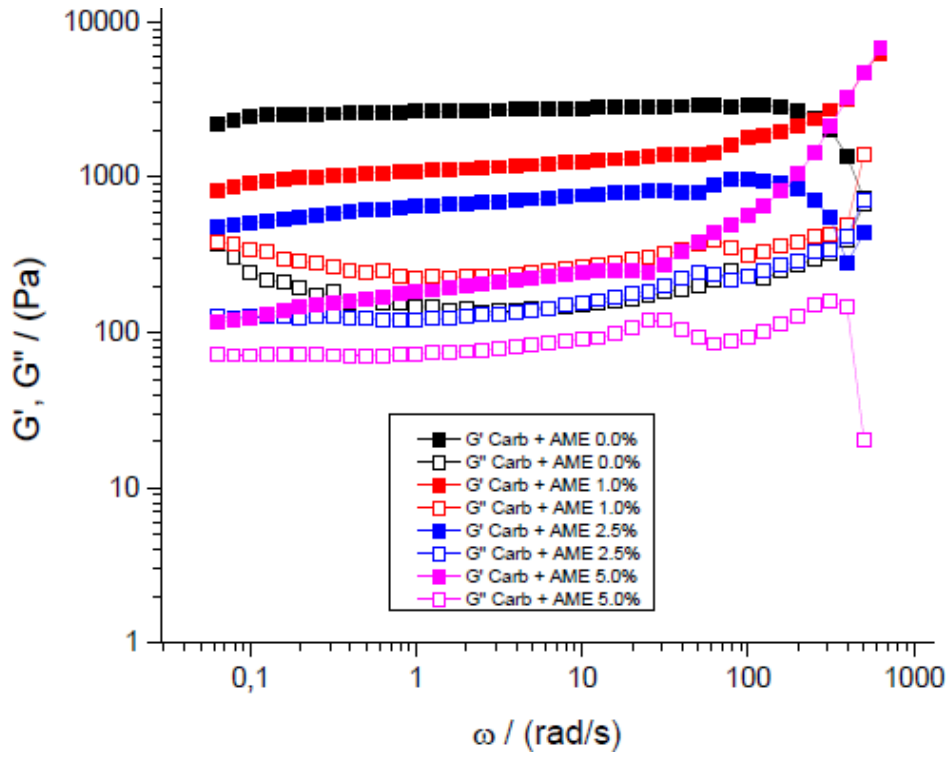


Figura 4 -

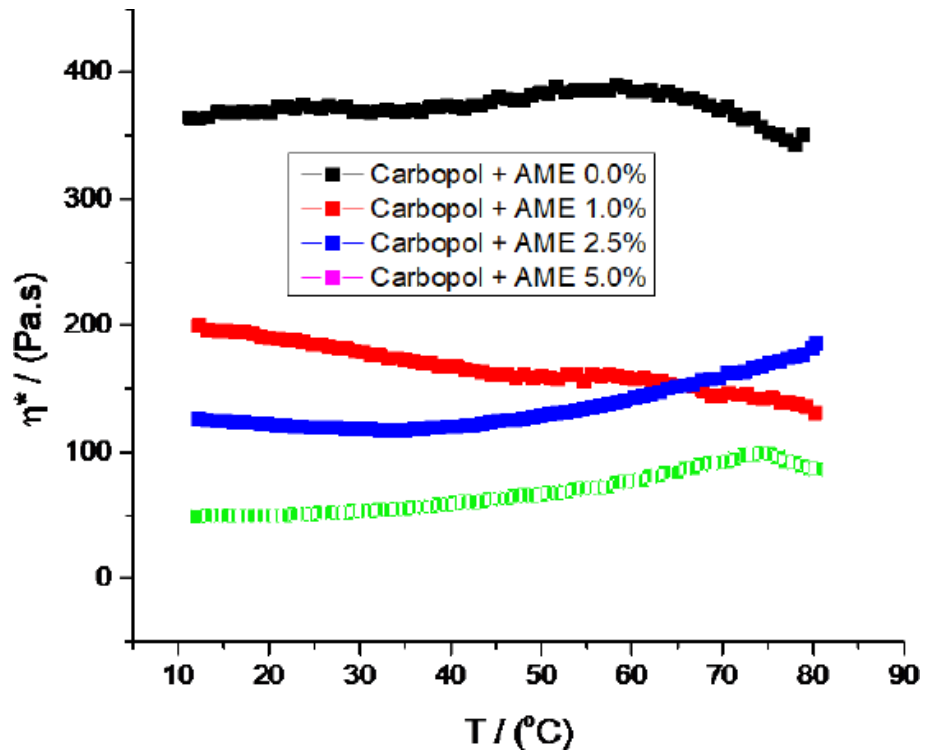


Figura 5 -

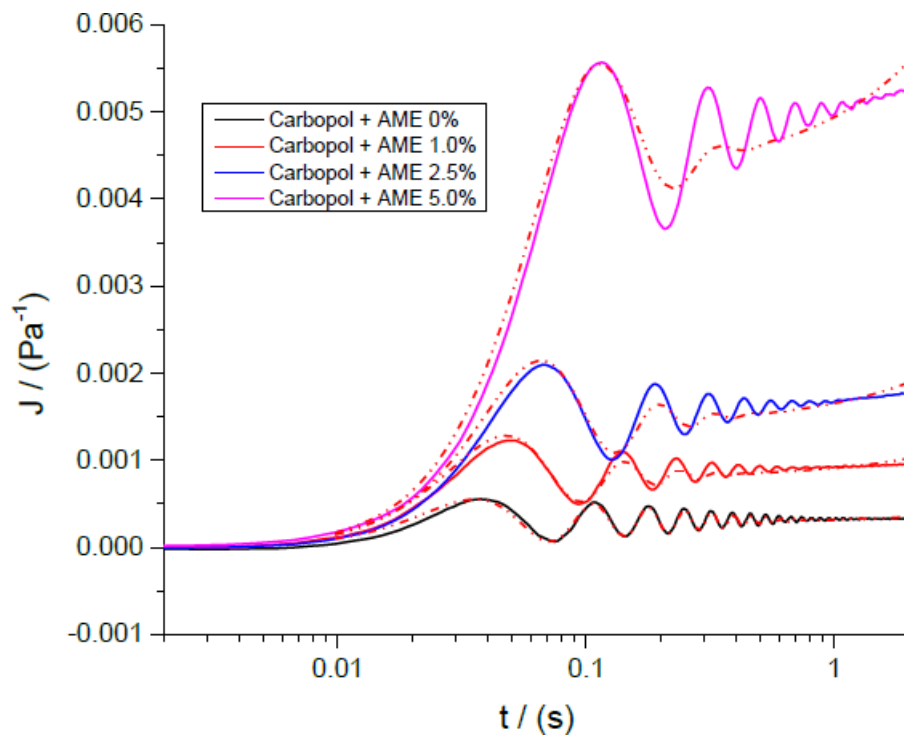


Figura 6 -

Parâmetros	Carb+AME0%	Carb+AME 1.0%	Carb+AME 2.5%	Carb+AME 5.0%
Módulo Elástico (Pa)	3401,00	1252,2	707,3	232,7
Tempo de Relaxação (s)	10,47053	7,03054	5,88228	6,7141
Tempo de Retardação (s)	10,46964	7,02578	5,87372	6,68887
Viscosidade do elemento de Jeffreys (Pa.s)	35607,26	8797,68	4154,48	1556,5
Viscosidade do elemento de Kelvin-Voigt (Pa.s)	3,01	5,957	6,0578	5,87
G' (Pa)	3400,99	1252,19	707,29	232,69
G'' (Pa)	268,09	396,50	299,82	163,60
Ringing angular frequency (rad/s)	87,84569	66,15412	49,16145	27,76512



Figura 7 –

Classe dos compostos	Compostos	Massa calculada		Erro (ppm)	Tr (Min)	Principais fragmentos (m/z)	Referência
<b>Sacarídeo</b>	Sacarose	342.1162	342.1068	- 27.68	1.1	381.0700 (M+K <sup>+</sup> ); 203.0461 (M-Glic + Na <sup>+</sup> )	Cardozo et al., 2012
<b>Flavonoide</b>	Rutina	610.15346	610.1409	- 20.58	2.1	611.1482 (M+H); 303.0424 (M-Rha-Glic)	Matsushige et al., 2012a
<b>Alcaloide</b>	xi-Anomuricina	329.1628	329.1539	- 27.03	2.4	330.1612 (M+H)	Leboeuf et al., 1981
<b>Flavonoide</b>	Kaempferol-3O-rutinosídeo	594.1585	594.1461	- 20.95	2.7	595.1534 (M+H); 449.0961 (M-Rha)	Nawwar et al., 2012
<b>Alcaloide</b>	Nornuciferina	281.14166	281.1338	- 27.95	3.0	282.1411 (M+H)	Hasrat et al., 1997a; Hasrat et al., 1997b;
<b>Alcaloide</b>	Xilopina	295.1209	295.1129	- 27.14	3.4	296.1202 (M+H)	Fofana et al., 2011
<b>Alcaloide</b>	Aterosperminina	309.1729	309.1648	- 26.45	4.2	310.1721 (M+H); 223.1723 (M-HCN-4CH <sub>3</sub> )	Leboeuf et al., 1981
<b>Ácido</b>	Ácido cafeico	180.0422	180.0518	52.87	4.4	203.0410 (M+Na);	Nam et al.,

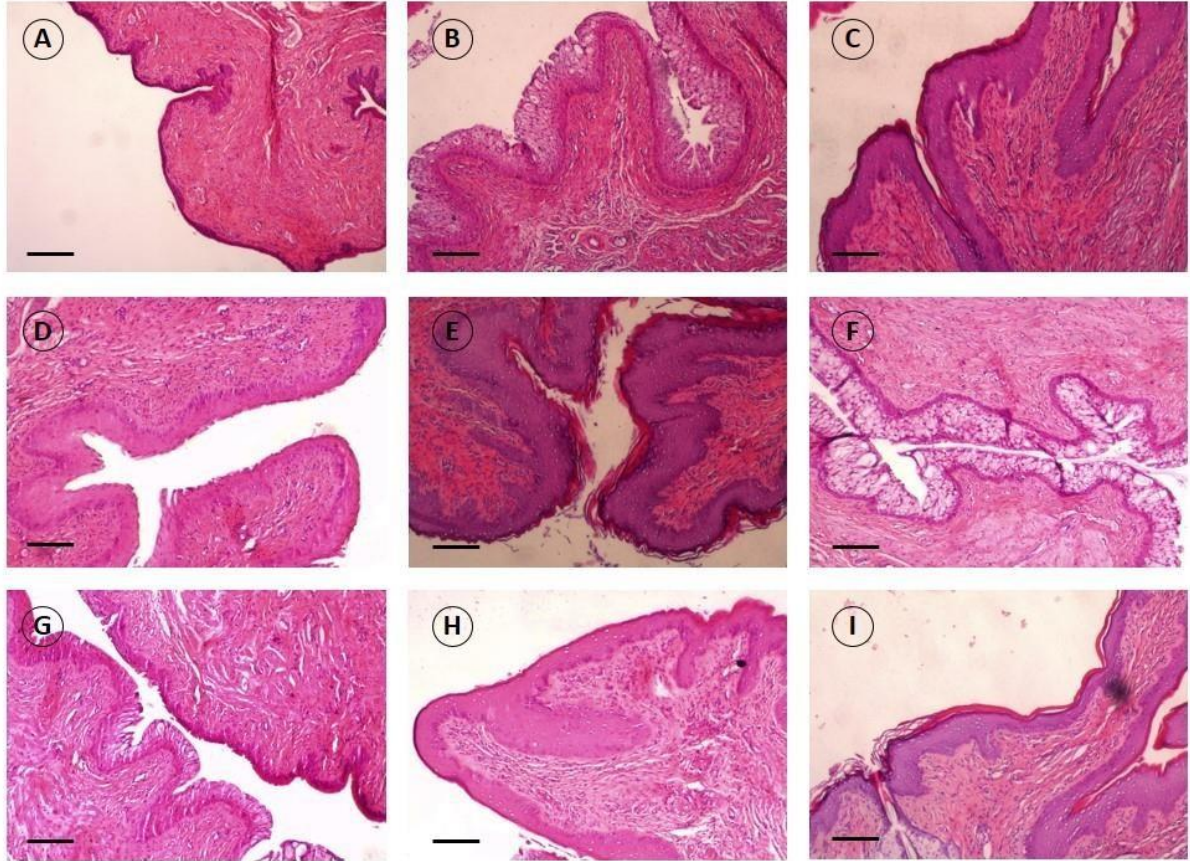
<b>fenólico</b>						181.0591 (M+H)	2017
<b>Alcaloide</b>	Asimilobina	267.1260	267.1046	- 80.11	4.8	306.0678 (M+K <sup>+</sup> )	Hasrat et al., 1997a; Hasrat et al., 1997b;
<b>Alcaloide</b>	S- Norcorydine	327.1471	327.1388	- 25.49	5.7	328.1461 (M+H)	Matsushige et al., 2012b
<b>Benzofurano</b>	Loliolida	196.1100	196.1103	+1,47	8.2	197.11 76 (M+H)	Cárdenas et al., 2021
<b>Acetogenina</b>	Anohexocina	628.4553	628.4555	+0.30	18.1	629.4628 (M+H)	Zeng et al., 1995
<b>Acetogenina</b>	Anomuricina A, C, ou E	612.4604	612.4603	-0,16	18.6	613.4676 (M+H)	Jaramillo et al., 2000; Kim et al., 1998; Wu et al., 1995.
<b>Acetogenina</b>	Anopentocina A, B, ou C	612.4604	612.4604	0.00	18.8	613.4677 (M+H)	Zeng et al., 1996

Tr - tempo de retenção.

Figura 8 -

Grupos	Dia 1		Dia 3		Dia 6		% de redução
	Animais infectados/N %	Log UFC/mL ± DP	Animais infectados/N %	Log UFC/mL ± DP	Animais infectados/N %	Log UFC/mL ± DP	
<b>Controle da infecção</b>	6/6	1,42 ± 0,13	6/6	1,98 ± 0,12	6/6	2,29 ± 0,10	0,0
<b>Gel AME 1,0%</b>	6/6	1,57 ± 0,22	6/6	1,38 ± 0,35	5/6	1,08 ± 0,27	31,2
<b>Gel AME 2,5%</b>	6/6	2,13 ± 0,70	6/6	1,38 ± 0,33	2/6	0,45 ± 0,55*	79,9**
<b>Gel Carbopol 0,5% (Branco)</b>	6/6	2,51 ± 0,70	6/6	2,67 ± 0,37	6/6	2,82 ± 0,31	0,0
<b>Veículo</b>	6/6	1,72 ± 0,40	6/6	2,20 ± 0,28	6/6	2,65 ± 0,20	0,0
<b>AME 0,2 mg/mL</b>	6/6	1,87 ± 0,56	6/6	1,63 ± 0,45	6/6	1,50 ± 0,43	19,9
<b>AME 1,0 mg/mL</b>	6/6	1,49 ± 0,30	6/6	1,18 ± 0,27	2/6	0,60 ± 0,55*	59,7**
<b>Nistatina</b>	6/6	2,05 ± 0,56	0/6	0,00 ± 0,00	0/6	0,00 ± 0,00*	100**

Figura 9 -



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstra que o extrato etanólico de *A. muricata* (AME) na sua forma livre e incorporado a uma base de carbopol tem atividade promissora contra *C. albicans* (ATCC® 10231), resistente a fluconazol, itraconazol, voriconazol e anidulafungina, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*.

Nossos resultados *in vitro* sugerem que AME tem capacidade de reduzir a densidade fúngica, alterar a curva de crescimento e agir no envoltório celular da célula. Os dados foram categóricos em aumentar a permeabilidade celular, atingindo a parede celular e alterar estruturas da membrana celular fúngica. Também observamos modificações na integridade do envoltório, alterando o potencial de membrana mitocondrial, resultando na sua despolarização. Além disso, o extrato foi capaz de reduzir a proliferação do biofilme, interferir na sua adesão, alterar a ultraestrutura da levedura e reduzir a matriz polimérica extracelular,

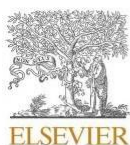
Nossos ensaios *in vivo* foi observado que AME livre e incorporado ao gel de carbopol diminuem a carga fúngica no lavado vaginal e, conseqüentemente, o tecido diminui o processo inflamatório resultante da invasão. A incorporação da carbopol é uma possibilidade de formulação de um possível produto com ação dermatológica, com vantagens em relação ao extrato livre, como a mucoadesividade. Além disso, as análises reológicas confirmaram o potencial e as vantagens do desenvolvimento da formulação, já que potencializa parâmetros de estabilidade, viscosidade e espalhabilidade do produto final.

Assim, este estudo demonstra que ambas amostras testadas podem ser usadas como uma possível alternativa terapêutica para infecções por *C. albicans* e/ou como terapia combinada com outros antifúngicos para controle das infecções fúngicas causadas por este microorganismo.

Ainda assim, outros estudos devem ser realizados com o intuito de aperfeiçoar a formulação, bem como compreender seus mecanismos de ação e suas características físico-químicas, garantindo assim uma possível aplicação no tratamento da VVC.

## ANEXO I

Journal of Ethnopharmacology 301 (2023) 115856



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jethpharm](http://www.elsevier.com/locate/jethpharm)

## Antifungal *Annona muricata* L. (soursop) extract targets the cell envelope of multi-drug resistant *Candida albicans*

Lara M. Campos<sup>a</sup>, Ari S.O. Lemos<sup>a</sup>, Irley O.M. Diniz<sup>a</sup>, Lucas A. Carvalho<sup>a</sup>, Thiago P. Silva<sup>b</sup>, Paula R.B. Dib<sup>c</sup>, Eugênio D. Hottz<sup>c</sup>, Luciana M. Chedier<sup>d</sup>, Rossana C.N. Melo<sup>b</sup>, Rodrigo L. Fabri<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Bioactive Natural Products Laboratory, Department of Biochemistry, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Cellular Biology, Department of Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil

<sup>c</sup> Laboratory of Immunothrombosis, Department of Biochemistry, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil

<sup>d</sup> Plant Chemistry Laboratory, Department of Botany, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Antifungal activity  
*Annona muricata*  
*Candida albicans*  
Chemical diversity  
Fungal cells  
Cell viability

## ABSTRACT

**Ethnopharmacological relevance:** *Annona muricata* L. (soursop) is traditionally used in the treatment of inflammatory diseases, cancer, and infections caused by fungi. The therapeutic activity explored by its medicinal use is generally associated with its phytoconstituents, such as acetogenins and alkaloids. However, its potential antifungal bioactivity as well as its mechanism of action remains to be established.

**Aim of the study:** To evaluate the antifungal activity of the ethanolic extract of *A. muricata* leaves against multidrug-resistant *Candida albicans* (ATCC® 10231).

**Material and methods:** Phytoconstituents were detected by UFLC-QTOF-MS. The minimum inhibitory concentration was determined, followed by the determination of the minimum fungicidal concentration. For planktonic cells, the growth curve and cell density were evaluated. Studies to understand the mechanism of action on the cell envelope involved crystal violet permeability, membrane extravasation, sorbitol protection, exogenous ergosterol binding assay, metabolic activity, and cell viability. Furthermore, mitochondrial membrane potential was assessed.

**Results:** Our analyses demonstrated a significant inhibitory effect of *A. muricata*, with the ability to reduce fungal growth by 58% and cell density by 65%. The extract affected both the fungal plasma membrane and cell wall integrity, with significant reduction of the cell viability. Depolarization of the fungal mitochondrial membrane was observed after treatment with *A. muricata*. Rutin, xi-anomuricine, kaempferol-3O-rutinoside, nonmuciferine, xylopin, atherosperminine, caffeic acid, asimilobine, s-norcoyridine, loliolide, anohexocin, anomuricin, anopentocin, and sucrose were identified as extract bioactive components.

**Conclusions:** Our findings show that the *A. muricata* extract is a source of chemical diversity, which acts as a potential antifungal agent with promising application to the therapy of infections caused by *C. albicans*.

## 1. Introduction

*Candida albicans* is a microorganism of clinical importance in invasive human diseases and generates high healthcare costs worldwide. These infections are considered emerging, especially in the immunocompromised population (Chen et al., 2020). However, current therapeutic choices for the treatment of invasive fungal infections are limited and are associated with high toxicity (Van Daele et al., 2019).

The restricted number of antifungal drugs available challenges the treatment of invasive pathologies. Currently, only four different classes of these drugs are used to treat numerous fungus-associated diseases: polyenes, azoles, nucleoside analogues, and echinocandins (Gintjee et al., 2020). Fungal pathogens are increasing their multidrug resistance properties and evolving virulence factors, which is particularly problematic in clinical settings (Jamiu et al., 2021). Alternative therapies such as natural products have been studied and directed towards

\* Corresponding author. Bioactive Natural Products Laboratory, Department of Biochemistry, Biological Sciences Institute, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais CEP 36036-900, Brazil.

E-mail address: [rodrigo.fabri@ufjf.br](mailto:rodrigo.fabri@ufjf.br) (R.L. Fabri).

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115856>

Received 23 August 2022; Received in revised form 3 October 2022; Accepted 18 October 2022

Available online 22 October 2022

0378-8741/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.