

Unesp - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Iara Pengo Tobias da Silva

**Prospecção de protótipos antifúngicos contra biofilmes de
Histoplasma capsulatum e *Paracoccidioides brasiliensis***

ORIENTADORA: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida

CO-ORIENTADORA: Kaila P. Medina Alarcón

Araraquara

2015

Unesp - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Iara Pengo Tobias da Silva

**Prospecção de protótipos antifúngicos contra biofilmes de
Histoplasma capsulatum e *Paracoccidioides brasiliensis***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de Farmacêutica Bioquímica. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Marisa Fusco Almeida.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida

CO-ORIENTADORA: Kaila P. Medina Alarcón

Araraquara

2015

Dedicatória

O desenvolvimento deste trabalho não foi uma tarefa fácil, porém foi uma experiência enriquecedora profissionalmente e eu não teria conseguido sem o apoio de meus pais Auricélia e Antônio Claudinei e de minha irmã Thais, que são minha família, meu alicerce. São as pessoas que não deixaram que eu desistisse no meio do caminho, me deram força, conforto e segurança para que eu pudesse concluir o curso de farmácia e bioquímica e este projeto no laboratório de micologia da Unesp – Araraquara.

Agradeço aos meus amigos de Araraquara, que, muitas vezes me deram conselhos e que tornaram a experiência da faculdade incrivelmente melhor, sem vocês com certeza eu não teria tanta energia e vontade de seguir até o fim.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus, pois sem Ele não estaríamos aqui e nada disso seria possível.

Agradeço à minha família Auricélia, Antônio Claudinei e Thais, vocês foram minha base desde o início até o fim.

Agradeço aos meus amigos, por tornarem minha vida muito melhor, por todos os conselhos e momentos maravilhosos que vivi ao lado de vocês.

Agradeço à República Katakara, minha casa em Araraquara, minha família para o resto da vida. Muito obrigada por tudo.

Agradeço a todos os profissionais do laboratório de Micologia clínica da Unesp Araraquara por terem me recebido tão bem e por me auxiliarem sempre que precisei.

Agradeço ao Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp.

Agradeço à minha co-orientadora Kaila Medina Alarcón, a pessoa que me ensinou tudo que eu aprendi neste laboratório. Muito obrigada por sua paciência, pelas horas do seu dia que você se dedicou a me ensinar. Você sempre esteve disposta a responder minhas dúvidas, que não foram poucas, a corrigir os meus trabalhos, e inclusive a me repreender quando algo saía errado, o que fez com que os meus resultados fossem sempre melhores. Com toda certeza você foi essencial para que este projeto se realizasse, muito obrigada pela dedicação.

Agradeço à minha orientadora Ana Marisa Fusco-Almeida, por toda sua dedicação, pela oportunidade concedida e por confiar em mim para a realização deste trabalho. Sou muito grata por me fornecer esta possibilidade de crescimento profissional e pessoal.

Resumo

A paracoccidioidomicose é uma doença de grande impacto social, sendo a sétima causa de morte entre as doenças crônicas infecciosas no Brasil, que responde por mais de 80% dos casos relatados mundialmente. A histoplasmose é uma micose endêmica em determinadas regiões das Américas, onde causa surtos frequentes. Sabe-se que os dois fungos dimórficos causadores destas doenças, *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) e *Histoplasma capsulatum* (Hc), respectivamente, são capazes de formar biofilme, uma forma de organização que os torna muito mais perigosos, difíceis de serem combatidos e que é essencial para o desenvolvimento de infecção. Além disso não existem muitas opções terapêuticas antifúngicas que não sejam tóxicas com o uso prolongado disponíveis no mercado atualmente. Estes fatos, deixam claro a necessidade de pesquisar novas formas de combater esses microrganismos, com o intuito de desenvolver fármacos menos tóxicos e mais eficientes. Uma nova possibilidade de opções terapêuticas com novas substância antifúngica são as chalconas, que foi o objeto de estudo desta pesquisa. Foi estudada a ação antifúngica de diversas moléculas de chalconas contra as formas planctônica e de biofilme dos dois fungos em questão. As chalconas que apresentaram menor valor de CIM₉₀ durante os ensaios com a forma planctônica foram selecionadas para o teste contra biofilme fúngico, estas chalconas foram T3, T24, T19, J4 e A20. Foi observado que estas substâncias possuem atividade antifúngica capaz de inibir 90% do crescimento fúngico do biofilme de Pb. Em relação ao biofilme de Hc, não obtivemos uma inibição de 90% com nenhuma molécula, a chalcona T3 foi a que apresentou a maior inibição atingindo 70%. Também foi estudado a citotoxicidade destas chalconas e algumas delas apresentaram bons valores de seletividade para o Pb, como a T3, T24, T19 e A20 porém, em relação ao Hc, apenas a T3 apresentou um valor de seletividade maior que 10. Diante de todos os testes realizados a substância T3 foi a que apresentou melhores resultados para os dois fungos e mostrou ter uma baixa taxa de citotoxicidade caracterizando uma substância promissora para o desenvolvimento de um protótipo antifúngico no futuro.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Resultado do percentual de inibição nas CIM das substâncias frente ao biofilme do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* após período de incubação de 48h. 25
- Figura 2 - Resultado do percentual de inibição nas CIM das substâncias frente ao biofilme do isolado EH315 de *H. capsulatum* após período de incubação de 48h. 26
- Figura 3 - Porcentagem de células viáveis de acordo com concentração das substâncias em µg/mL. 27
- Figura 4 - Fotomicrografia MEV (microscopia eletrônica de varredura) do controle positivo (sem tratamento) do biofilme de *P. brasiliensis* (cepa18) com 24h de formação. 30
- Figura 5 - Fotomicrografia (MEV) microscopia eletrônica de varredura do biofilme do isolado de Pb18 de *P. brasiliensis* tratado com 31,25µg/mL da substância chalcona T3 durante 48 horas de tratamento. 31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - CIM 90 planctônico para <i>P.brasiliensis</i>	20
Tabela 2 - CIM90 planctônico para <i>H. capsulatum</i>	22
Tabela 3 - Estrutura molecular das chalconas	23
Tabela 4 - CIB de <i>P. brasiliensis</i>	24
Tabela 5- CIB de <i>H. capsulatum</i>	25
Tabela 6 - IC50 das substâncias e I.S para <i>P.brasiliensis</i> cepa18 e <i>H. capsulatum</i> cepa EH315 em sua forma planctônica	27
Tabela 7 - I.S para biofilme de <i>P.brasiliensis</i> cepa18 e <i>H. capsulatum</i> cepa EH315	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
ul	Microlitro
BHI	Brain Heart Infusion
IC50	Concentração Inibitória para 50% das células
CIB	Concentração Inibitória de Biofilme
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIM 90	Concentração que leva à redução em 90% da atividade
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
FUM	Fluido universal modificado
IBILCE	Instituto de Biociências, Letras e Ciências exatas
IFI	Infecções fúngicas invasivas
IS	Índice de seletividade
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MRC-5	Fibroblastos de pulmão humano fetal
nm	Nanômetro
PBS	Tampão fosfato de sódio
Pb18	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> cepa 18
PCM	Paracoccidioidomicose

pH	Potencial hidrogeniônico
Rpm	Rotações por minuto
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
SBF	Soro Fetal Bovino
UFC	Unidade Formadora de Colônia
XTT	2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[carbonilo(fenilamino)]- 2H-tetrazólio-hidróxido)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBEJTIVOS	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 Cultivo de microrganismos	15
3.2 Obtenção das moléculas de T-chalconas	16
3.3 Avaliação da atividade antifúngica pela técnica de microdiluição	16
3.4 Determinação da viabilidade das células fúngicas através da redução da Resazurina	17
3.5 Ensaio com biofilme em formação	17
3.5.1 <i>P. brasiliensis</i>	17
3.5.2 <i>H. capsulatum</i>	18
3.6 Determinação da atividade metabólica do biofilme através da redução do XTT	18
3.7 Cultura de células para teste de citotoxicidade	19
3.8 Avaliação do potencial citotóxico	19
3.9 Microscopia eletrônica de varredura	20
4. RESULTADOS	20
4.1 CIM planctônico – técnica de microdiluição	20
4.1.1 <i>P. brasiliensis</i>	20
4.1.2 <i>H. capsulatum</i>	22
4.2 Seleção das substâncias	23
4.2.1 Estrutura molecular	23
4.3 Tratamento de biofilme em formação	24
4.3.1 <i>P. brasiliensis</i>	24
4.3.2 <i>H. capsulatum</i>	25
4.4 Citotoxicidade	26
4.5 Análise estatística dos dados de citotoxicidade	28
4.6 Microscopia eletrônica de varredura	29
5. DISCUSSÃO	32
6. CONCLUSÃO	36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1.INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas invasivas (IFIs) tem mostrado alteração em relação à incidência nas últimas décadas, uma vez que o prognóstico de pacientes tem melhorado devido aos avanços diagnósticos e terapêuticos, incluindo novos antifúngicos, porém, as taxas de morbidade e a mortalidade continuam elevadas (OSTROSKY-ZEICHNER, 2012; MARTÍN-PEÑA; AGUILAR-GUISADO; CISNEROS, 2013). Com isto a incidência das IFIs elevou os custos com os serviços de saúde, especialmente nas unidades de terapia intensiva (UTI) (PEMÁN; ZARAGOZA, 2012).

Muitos estudos realizados em diferentes partes do mundo mostram a prevalência de *Candida* spp, *Aspergillus fumigatus* (NEOFYTOS *et al.*, 2010; KRIENGKAUYKIAT; ITO; DADWAL, 2011; PRATES *et al.*, 2013). No Brasil, Zicker e colaboradores (2011) avaliaram a epidemiologia de IFI em pacientes transplantados de fígado e observaram que mais de 13% apresentaram infecções fúngicas, sendo as mais comuns causadas por esses agentes fúngicos (ZICKER *et al.*, 2011).

Outro estudo realizado no Brasil por Colombo e colaboradores (2012), investigaram as causas de mortalidade relacionadas às infecções fúngicas no Hospital de São José do Rio Preto (FAMERP) no período de 2000 a 2009, onde foi observado que pacientes com infecções fúngicas correspondiam a 1,4% das mortes observadas. Quando os autores avaliaram a mortalidade por infecções fúngicas associadas à AIDS, foram relacionados à candidíase e histoplasmoze (COLOMBO *et al.*, 2012). Resultados semelhantes foram descritos por Prado e colaboradores em 2009, que em um estudo epidemiológico brasileiro, constatou maior mortalidade por paracoccidiodomicose entre os indivíduos imunocompetentes; porém quando avaliada a mortalidade associada à AIDS os dados também indicaram a histoplasmoze além da criptococose.

A paracoccidiodomicose (PCM) é uma doença fúngica de grande impacto social, uma vez que afeta principalmente trabalhadores rurais do sexo masculino, sendo a sétima causa de morte entre as doenças crônicas infecciosas no Brasil (BARROZO *et al.*, 2009).

A razão de acometimento da PCM em adultos varia entre 10 a 15 homens para 1 mulher, o que não ocorre na infância, onde a infecção e a doença se distribuem uniformemente entre ambos os sexos, com ligeiro predomínio do masculino em adultos jovens (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006). A predominância da infecção em homens está

associada ao possível efeito protetor hormonal feminino, uma vez que há receptores para estrógenos na parede do fungo, capazes de bloquear a transformação de micélios ou conídios para forma leveduriforme (infectante) (PINZAN et al., 2010).

No adulto, a forma clínica predominante é a crônica, mas quando acomete crianças ou adolescentes apresenta-se na forma aguda ou subaguda. Quando não diagnosticada e tratada oportunamente, pode levar a formas disseminadas graves e letais, com rápido e progressivo envolvimento dos pulmões, tegumento, gânglios, baço, fígado e órgãos linfóides do tubo digestivo (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

A PCM tem sua distribuição geográfica global restrita, encontrada na América Central, no Sul do México e Argentina. (NUCCI et al., 2009; SHANKAR et al., 2011). Além disso, a distribuição de PCM não é homogênea dentro de um determinado país endêmico, mas prevalece em áreas que possuem condições adequadas para a sobrevivência e crescimento do fungo, facilitando assim, a exposição humana (SHANKAR et al., 2011). No Brasil há uma taxa de incidência anual estimada por volta de 10 a 30 casos por milhão de habitantes e a taxa média de mortalidade é de 1,4 mortes por milhão de habitantes (BITTENCOURT et al., 2005; JOHANN et al., 2010).

Pouco se sabe sobre o habitat de *Paracoccidioides brasiliensis*, porém, esse fungo tem sido encontrado no solo, na água, em plantas de áreas endêmicas e, mais recentemente em tatus, mas nenhum desses estudos até o momento pode estabelecer definitivamente seu nicho ecológico (BAGAGLI et al., 2006).

A histoplasmose, originalmente nomeada de doença de Darling (LACAZ, 2002), é uma micose sistêmica causada pelo fungo *Histoplasma capsulatum* variedade *capsulatum* (Aidé, 2009).

Sabe-se que esta doença é endêmica em determinadas regiões das Américas, onde há a existência de surtos frequentes (TAYLOR; GRANADOS *et al.*, 1996; TAYLOR et al., 2005; ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2010), no entanto alguns casos são relatados na Europa e na Ásia. Na região dos Estados Unidos, há destaque para as regiões dos rios Ohio e Mississippi aonde ocorreram muitos casos da doença (WHEAT *et al.*, 2000).

A contaminação se dá através da inalação de microconídios ou fragmentos de hifas. A partir da inalação a extensão da doença respiratória vai depender da capacidade das leveduras de *Histoplasma* sobreviver e replicar dentro dos macrófagos alveolares. Se o indivíduo for

imunocomprometido as leveduras podem se replicar a ponto de atingirem a circulação sanguínea e se disseminar para outros órgãos, como fígado e baço. Neste caso a doença assumirá a sua forma disseminada, considerada a forma mais grave de histoplasmose (AJELLO, 1998; DEEPE, 2009; DIAS *et al.*, 2011).

Os sintomas vão depender do sistema imune do hospedeiro e da carga fúngica inalada, as manifestações clínicas podem ir desde uma infecção assintomática, em hospedeiros imunocompetentes após baixa exposição de inóculo, até uma infecção disseminada e rapidamente fatal em hospedeiros imunocomprometidos. (DEEPE, 2009; ANTONELLO *et al.*, 2011; KROETZ ; DEEPE, 2011). Dessa forma, em pacientes imunocomprometidos e, especialmente em pacientes HIV positivo, a histoplasmose é considerada oportunista, pode se disseminar para outros órgãos além dos pulmões e, se não tratada, leva à morte em quase 100% dos casos. (MAUBON *et al.*, 2007). Além disso, cepas de *H. capsulatum* previamente não consideradas virulentas podem ser letais para estes pacientes (WHEAT *et al.*, 1990; GUIMARÃES *et al.*, 2006).

Recentemente nosso grupo através de Pitangui e colaboradores (2012), verificaram a capacidade de *H. capsulatum* formar biofilmes *in vitro* e manter esta forma durante a infecção em pneumócitos humanos, mostrando que a formação deste pode auxiliar na invasão do fungo às células epiteliais de pulmão e que estes constituem estruturas cruciais no desenvolvimento de infecções. *Paracoccidioides brasiliensis* também é capaz de formar biofilmes em condições microaerófilas e aparentemente esta forma de crescimento do fungo também estaria relacionada à virulência e resistência (Sardi *et al.*, 2015).

Um passo necessário na colonização e, em última instância, no desenvolvimento de doenças por patógenos, está associado à sua habilidade de se aderir às superfícies do hospedeiro, a capacidade de aderência é um fenômeno biológico vastamente distribuído, compartilhado por diversos organismos para capacitá-los a colonizar seus respectivos habitats. Muitos fungos, especialmente os patogênicos, são capazes de aderir ao tecido do hospedeiro, sendo este o primeiro passo no processo de formação do biofilme.

Biofilmes são estruturas com alto grau de organização e podem se desenvolver em meios bióticos ou abióticos. São estruturas cruciais para o desenvolvimento de infecções e são uma forma de resistência aos agentes antimicrobianos (PIERCE *et al.*, 2005; SARDI *et al.*, 2010). O processo de adesão às superfícies do hospedeiro envolve fatores biológicos e fatores não biológicos. No que diz respeito aos fatores biológicos a adesão é regulada por

mecanismos moleculares específicos, as adesinas. (WATERS et al., 1997). Em estudos verificou-se que a formação de biofilme está associada à expressão de diferentes adesinas (BISCOLA et al., 2011). Nos biofilmes pode se encontrar uma grande variedade de micro-organismos tais como bactérias (inclusive micobactérias), fungos leveduriformes e algas (JABRA-RIZK *et al.*, 2004; RAMAGE *et al.*, 2005). Alguns estudos têm reportado a participação das leveduras *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* e de alguns fungos filamentosos em infecções associadas à formação de biofilme (RAMAGE *et al.*, 2009; LEWIS, 2011).

O aumento da resistência aos antimicrobianos, em conjunto com o número restrito de drogas antifúngicas disponíveis comercialmente e que ainda apresentam muitos efeitos adversos, são a causa do aumento da morbidade e mortalidade pelas infecções fúngicas. Logo, há a necessidade de desenvolvimento de antifúngicos novos e mais eficazes e os produtos naturais são protótipos atraentes para esse fim, devido ao seu amplo espectro de atividades biológicas (MARTIN et al., 2013).

As chalconas são substâncias classificadas como flavonóides de cadeia aberta. Destacam-se por apresentarem diversidade estrutural no reino vegetal e também grande variedade de atividades biológicas devido à presença de muitos compostos fisiologicamente ativos e por serem substratos para a realização de várias sínteses orgânicas. (SIMÕES *et al.*, 2006; BRANDÃO 2010; BANDAY *et al.*, 2011; KATSORI et al., 2011).

Foi verificada a ação de moléculas chalconas contra *P. brasiliensis*, *C. albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Cryptococcus gattii* e como resultado algumas chalconas apresentam uma atividade antifúngica potente para *P. brasiliensis* e *C. gattii*. Também foi observada atividade antitumoral, a qual foi avaliada nas linhagens tumorais UACC-62 (melanoma), MCF-7 (adenocarcinoma) e TK-10 (carcinoma renal) (TAVARES, JOHANN *et al.*, 2011).

Brandão e colaboradores (2010) relataram em seu estudo a atividade antibacteriana, antiviral das chalconas. Vários estudos mostraram o seu potencial antimalárico, anti-leishmania, anti-HIV, antifúngico, anti-tuberculose e como inibidores da tirosina quinase (SVETAZ et al., 2004; BOECK et al., 2006; CHEENPRACHA et al., 2006; VALLA et al., 2006; YANG et al., 2007; MURRAPU et al., 2011).

Foi realizado um estudo pelo laboratório de micologia clínica da UNESP- Araraquara, em colaboração com o Instituto de Química IQ-UNESP e IBILCE UNESP de São José do Rio Preto para avaliar a atividade antifúngica de uma coleção de moléculas de chalconas sintéticas. Muitas destas chalconas apresentaram atividade contra espécies de *Candida*, *Cryptococcus*, *Paracoccidioides* e *Histoplasma capsulatum*. Pode-se verificar que a posição da hidroxila na molécula de chalcona defini a eficiência antifúngica exercida sobre os isolados das espécies acima citadas. Em outro estudo realizado por este laboratório, avaliou-se a atividade antifúngica de moléculas de chalconas contendo hidroxilas nas posições 2'-hidroxichalcona, 4'-hidroxichalcona, 2,5 dihidroxichalcona e estas apresentaram potencial atividade fungistática contra isolados das espécies de *Paracoccidioides* sp. A citotoxicidade frente a um banco celular humano também foi analisada e a viabilidade celular chegou a 97%. Assim os derivados destas moléculas foram selecionados para o desenvolvimento de um protótipo terapêutico antifúngico. Desta forma a viabilização da CIM será promissora para a inclusão de ensaios contra biofilmes desta espécie, uma vez que maiores concentrações das moléculas serão necessárias. Por outro lado chalconas também foram testadas contra *H. capsulatum* e a eficiência antifúngica representada pela CIM variou de 7,8 a 62,5 µg/mL (ALARCÓN, 2015).

2.OBJETIVOS

2.1. Avaliar a atividade antifúngica de T-chalcona contra *P. brasiliensis*, e *H. capsulatum* na forma planctônica e de biofilme.

2.2. Verificar o potencial citotóxico de T-chalcona em linhagens celulares humanas

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultivo dos Microrganismos

Foram utilizados isolados de *Paracoccidioides* da espécie filogenética *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado 18 , na fase leveduriforme, pertencentes à coleção do laboratório de Micologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, todas as amostras foram cultivadas em ágar Fava Neto e

incubadas a uma temperatura de a 37 °C e repicados a cada 3 ou 4 dias (FAVA NETTO, 1961; DE PAULA E SILVA et al., 2013).

Para a realização dos ensaios com isolados de *H. capsulatum* foi selecionada a cepa de *H. capsulatum*, cepa EH-315, cedida gentilmente pela professora Dr^a. Maria Lúcia Taylor da UNAM (Universidade Nacional do México), isolada do intestino de morcego infectado, espécie *Mormoops megalophylla*, capturado em uma caverna no Estado de Guerrero, México.

A fase leveduriforme da cepa foi mantida em meio infusão cérebro-coração caldo (BHI-broth) (*Difco*TM) suplementado com 0,1% de cisteína e 1% de glicose, e incubado a 37 °C durante 24 horas sob agitação (100 rpm).

3.2. Obtenção das moléculas de T-Chalconas

As moléculas de T-chalconas foram sintetizadas pelo Prof. Dr. Luis Octávio Regasini do IBILCE de São José do Rio Preto através do projeto Biota-FAPESP, Bioprospecta-FAPESP e Sisbiota CNPq, em associação com o grupo de pesquisa da Profa. Dra. Vanderlan da Silva Bolzani do Instituto de Química da UNESP–Araraquara.

As chalconas foram diluídas em DMSO e armazenadas na câmara fria.

3.3. Avaliação da atividade antifúngica pela técnica de microdiluição

Todos os ensaios foram realizados de acordo com o documento M27-A2 (2002) do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

Para o desenvolvimento da metodologia, foi utilizado, para o *P. brasiliensis* e *H. capsulatum*, o meio RPMI 1640 com glutamina, sem bicarbonato e com indicador vermelho de fenol, tamponado com MOPS [ácido 3-(N-morfolina) propanosulfônico] pH 7,0 acrescido com 2% de glicose, esterilizado por filtração e conservado a 4°C. Para o Os ensaios foram desenvolvidos da seguinte forma, as colunas e fileiras que circundam a placa foram preenchidas com água para evitar um possível ressecamento. A coluna 2 foi utilizada para controle de esterilidade das chalconas. As colunas 10 e 11 foram utilizadas como controle positivo e negativo do teste respectivamente. O controle positivo continha meio de cultivo com uma concentração fúngica com suspensão celular de concentração $1,5 \times 10^3$ UFC/mL. O controle negativo continha apenas meio de cultura. A partir da coluna 3 a 9, nas fileiras B a G,

foram colocadas diluições decrescentes do composto em estudo com concentração inicial de 250µg/mL, assim como do controle de tratamento utilizado. Em seguida, foi adicionada a suspensão celular na concentração de $1,5 \times 10^3$ UFC/mL, posteriormente as placas foram incubadas a 37°C, por um período total de 48 horas, com agitação a 150 rpm. Após esse período foi adicionado o indicador de viabilidade celular, resazurina, para confirmação da CIM. As placas foram incubadas por mais dois dias pós a adição do indicador e finalmente foram analisadas por meio de leitura visual e por leitura de fluorescência no comprimento de onda (leitura a 570nm). Foi considerado a CIM₉₀, ou seja, a concentração onde há inibição de 90% do crescimento para todas as linhagens. Os ensaios foram realizados em duplicata em dois experimentos independentes.

3.4. Determinação da viabilidade das células fúngicas através da redução da resazurina

A resazurina é o componente ativo do composto MABA (Alamar Blue). É permeável, azul e não possui fluorescência. O seu mecanismo para determinar a viabilidade das células consiste no fato de que, após penetrar em células viáveis, a resazurina é reduzida pelas células em resofurina, um composto rosa fluorescente (PAULA E SILVA et al, 2013). Através da leitura da fluorescência obtemos o valor de inibição de crescimento fúngico que a chalcona proporcionou.

3.5. Ensaio com biofilmes em formação:

3.5.1. Para *Paracoccidioides sp*

Inicialmente, as leveduras foram suspensas em Fluido Universal Modificado (FUM) e a suspensão foi ajustada à concentração de $1,5 \times 10^6$ células/mL, por contagem em câmara de Neubauer. Em seguida, 200 µL do inóculo foram adicionados à placa de 96 poços. A placa foi incubada a 37 °C, por 24 horas para pré- adesão. Uma formação inicial de biofilme é observada depois de 7 horas. (Sardi et al, 2015).

Após esse período foi retirado o meio de cultivo e lavado com PBS duas vezes com muito cuidado para não destruir o biofilme e posteriormente foram adicionados 100uL das substâncias já previamente diluídas seriadamente, partindo da concentração inicial de 500µg/ml. Foram feitos tratamento de 24 e 48 horas. Após o término do tempo de tratamento

foi adicionado o reagente 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[carbonilo(fenilamino)]-2H-tetrazólio-hidróxido (XTT), contendo menadiona, e após três horas de reação foram feitas as leituras visual e espectrofotométrica a 492 nm. Em todos os experimentos, foram incluídos meio como controle negativo, controle de esterilidade das drogas e controle positivo, composto pelas células fúngicas na concentração de $1,5 \times 10^6$ células/mL. A droga controle utilizada foi a Anfotericina B.

3.5.2. Para *Histoplasma capsulatum*

Inicialmente, as leveduras foram centrifugadas a 1500rpm durante 5 minutos e resuspensas em meio BHI 1%, este processo foi realizado duas vezes. Posteriormente, as células foram suspensas em BHI 1% e a suspensão ajustada à concentração de $1,5 \times 10^6$ células/mL por contagem em câmara de Neubauer. Em seguida, 200 μ L do inóculo foram adicionados à placa de 96 poços e a placa foi incubada durante 24 horas em shaker orbital a 80 rpm, 37 °C. A agitação durante o crescimento do biofilme aumenta a síntese de matriz extracelular polimérica (AL-FATTANI; DOUGLAS, 2006). Após 24 horas, o meio foi retirado, os poços foram lavados com PBS e foram adicionadas as chalconas já previamente diluídas seriadamente, com concentração inicial de 500 μ g/ml. Foram feitos tratamento de 24 e 48 horas. Após o término do tempo de tratamento foi adicionado o reagente XTT, contendo menadiona, e após três horas de reação foram feitas as leituras visual e espectrofotométrica. Em todos os experimentos foram incluídos meio como controle negativo, controle positivo contendo meio mais inóculo e controle de esterilidade de droga. A droga controle utilizada foi o cetoconazol.

A partir da cinética observada na curva de crescimento já previamente realizada foi possível observar que a cepa EH315 produz biofilme fortemente de 24 a 72 horas. (Pitangui et al.,2012).

3.6. Determinação da atividade metabólica do biofilme pelo ensaio de redução do XTT

Uma medida semiquantitativa da formação dos biofilmes foram obtidas a partir do ensaio de redução do XTT. Para o ensaio, 50 μ L de solução de sal de XTT (1 mg/mL em PBS) e 4 μ L de solução de menadiona (1 mM em etanol; Sigma) foram adicionados a cada poço. Atividade da desidrogenase mitocondrial fúngica reduz o sal de tetrazólio XTT a

formazana, resultando em alteração colorimétrica que se correlaciona com a viabilidade celular. A mudança colorimétrica foi medida utilizando um leitor de microtitulação (*iMarkTM Microplate Reader; BIO-RAD*) a 492nm.

3.7. Cultura de células.

Nos ensaios de cultura celular foram utilizadas as linhagens MRC-5 (fibroblastos de pulmão humano fetal transformados com vírus SV40), gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Elza Tiemi Sakamoto Hojo, Laboratório de Genética, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.

As células foram cultivadas em garrafas com o meio DMEM, acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) e 2 % de antibiótico ATB (complexo estreptomicina, penicilina, gentamicina e anfotericina B). As células foram mantidas à temperatura de 36,5°C com 10% de CO₂ por uma semana, então o meio foi retirado e as células foram lavadas com 5 mL de PBS e tripsinizadas. Em seguida foi adicionado o meio de cultivo com 10 % SFB para neutralização da tripsina evitando danos às células. Com essa suspensão celular, foram preparadas placas para os ensaios de citotoxicidade das substâncias antifúngicas.

3.7.1. Avaliação do potencial citotóxico

Para a avaliação a citotoxicidade das substâncias, foram preparadas placas de 96 poços, contendo 1×10^5 células por poço, a viabilidade das células foi observada através de azul de tripan. As placas foram incubadas a 36,5 °C com 5% de CO₂, por 24 horas para a formação da monocamada celular (Husoy *et al.*,1993) e então foram adicionadas as substâncias. A viabilidade celular foi estudada nas concentrações próximas da CIM, assim como a concentração onde apresentam 80% de células vivas. A citotoxicidade foi avaliada através do ensaio da sulforodamina B (SRB) a 0,1%, O ensaio é sensível e mede o conteúdo de proteína celular das células aderidas nas placas. As células foram fixadas com ácido tricloro acético (TCA) e então coradas por 30 min com SRB dissolvida em ácido acético. Em condições levemente ácidas, SRB se liga aos resíduos de aminoácidos básicos das células fixadas com TCA. O corante não ligado é então removido após a lavagem e o corante ligado à proteína é solubilizado em meio básico (Tris-base). A absorbância foi mensurada pelo leitor de microplaca em 570 nm. Como controle positivo foi usado Cumarina. O resultado da percentagem de células viáveis, foi realizado através da seguinte equação:

Eq. 1. Células viáveis % = (média do teste - média do branco/ média do controle negativo - média do branco) X 100.

3.9 Microscopia eletrônica de varredura (M.E.V)

O biofilme formado nas lamínulas será processado conforme descrito por (MORRIS, MONIER et al., 1997) e modificado (Ells e Truelstrup Hansen, 2006). Foram utilizadas duas placas de 24 poços e o experimento foi realizado em duplicata em um experimento independente. Em cada placa foi feito um controle positivo contendo meio e células fúngicas com concentração de $1,5 \times 10^6$ células/mL para formação do biofilme de *P. brasiliensis*. Foram feitas duas placas, 24 e 48 horas. O meio utilizado foi o FUM. Primeiramente formou-se o biofilme em concentração de $1,5 \times 10^6$ células/mL nas placas de 24 e 48 horas e esperou um dia para adesão. No segundo dia foi adicionada a substância em estudo às placas de 24 e 48 horas. Posteriormente a este tempo foi adicionado gluteraldeído 2,5% com o intuito de paralisar a reação. As placas foram mantidas a 4°C por 18 horas e então o gluteraldeído foi retirado, os poços foram lavados com PBS e os biofilmes das placas foram desidratados com etanol nas concentrações de 50 a 100%. Características topográficas dos biofilmes foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura Zeiss-Leica/440 do Instituto de Química da UNESP, operado a 25 kV.

4. RESULTADOS

4.1 MIC planctônico – técnica de microdiluição

As tabelas a seguir mostram os valores de CIM₉₀ encontrados durante o ensaio de microdiluição com o isolado Pb18 de *P.brasiliensis* e EH315 de *H.capsulatum*

4.1.2 *P. brasiliensis* (Pb18)

Chalcona	CIM ₉₀ (µg/ml)
D2	7,8
G4	1,9

G3	7,8
G21	15
J20	7,8
G18	1,9
D4	0,97
D23	0,97
J4	0,97
T37	0,48
A20	0,97
A8	5,5
T38	0,48
T3	0,48
G23	3,9
D3	15,6
G24	3,9
J15	3,9
A7	7,8
D1	7,8
G5	3,9
A8	0,97
G2	7,8
A14	3,9

A17	3,9
T1	3,8
A18	7,8
A4	7,8
A2	7,8
T19	0,97
T24	0,97
Anfotericina B	0,12

Tabela 1. CIM₉₀ planctônico do isolado Pb18 de *P. brasiliensis*.

4.1.3 *Histoplasma capsulatum* (EH315)

A técnica de microdiluição foi realizada para as chalconas que apresentaram os melhores resultados durante o ensaio com o *P.brasiliensis*.

Chalcona	CIM ₉₀ (µg/ml)
J4	32
T38	62
T3	1,97
T19	7,8
T24	31,24
T37	62
A20	7,8

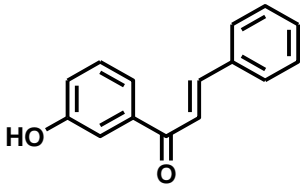
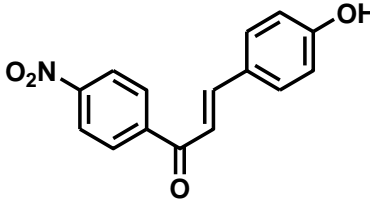
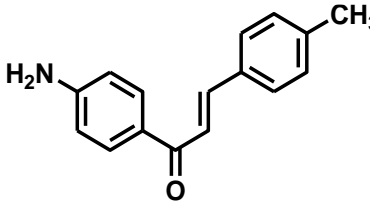
Tabela 2. CIM₉₀ planctônico da cepa EH315 de *H. capsulatum*.

Os resultados das concentrações inibitórias mínimas dos dois fungos são baseados na leitura visual a partir da mudança de coloração que a resazurina proporcionou e a partir de leitura por fluorescência. A porcentagem de inibição no CIM é de 90%, inibindo, portanto, o crescimento de 90% dos fungos, caracterizando concentrações fungistáticas das substâncias em questão.

4.2 – Seleção de substâncias

As chalconas que obtiveram melhores concentrações inibitórias mínimas em teste com concentrações planctônicas foram selecionadas para o teste em biofilme fúngico. As substâncias selecionadas foram, T3, T24, T19, J4 e A20. Ambas as substâncias apresentaram resultados favoráveis para *P. brasiliensis* e *H. capsulatum*.

4.2.1 – Estrutura molecular

Substância	Massa Molecular (g mol ⁻¹)	Estrutura
T3	224,25	
T24	269,25	
T19	237,30	

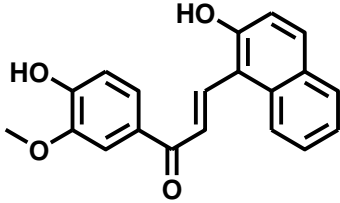
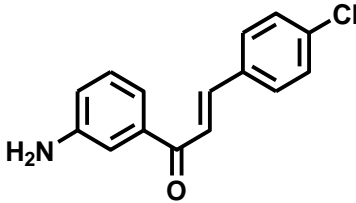
A20	320,34	
J4	257,71	

Tabela 3. Estrutura molecular das chalconas selecionadas para teste em biofilme.

4.3 Tratamento de biofilme em formação

4.3.1- *P. brasiliensis* (Pb18)

A tabela abaixo mostra as concentrações inibitórias de biofilme para inibição de 90% do crescimento, exceto para a substância T24 que provocou uma inibição do crescimento de 80%.

Chalcona	CIB ($\mu\text{g/mL}$) 24 horas	CIB ($\mu\text{g/mL}$) 48 horas
T3	31,25	31,25
T19	125	62,5
A20	31,25	31,25
T24	125	125
J4	31,25	31,25
Anfotericina B	7,8	7,8

Tabela 4. CIB para biofilme do isolado Pb18 de *P. brasiliensis*.

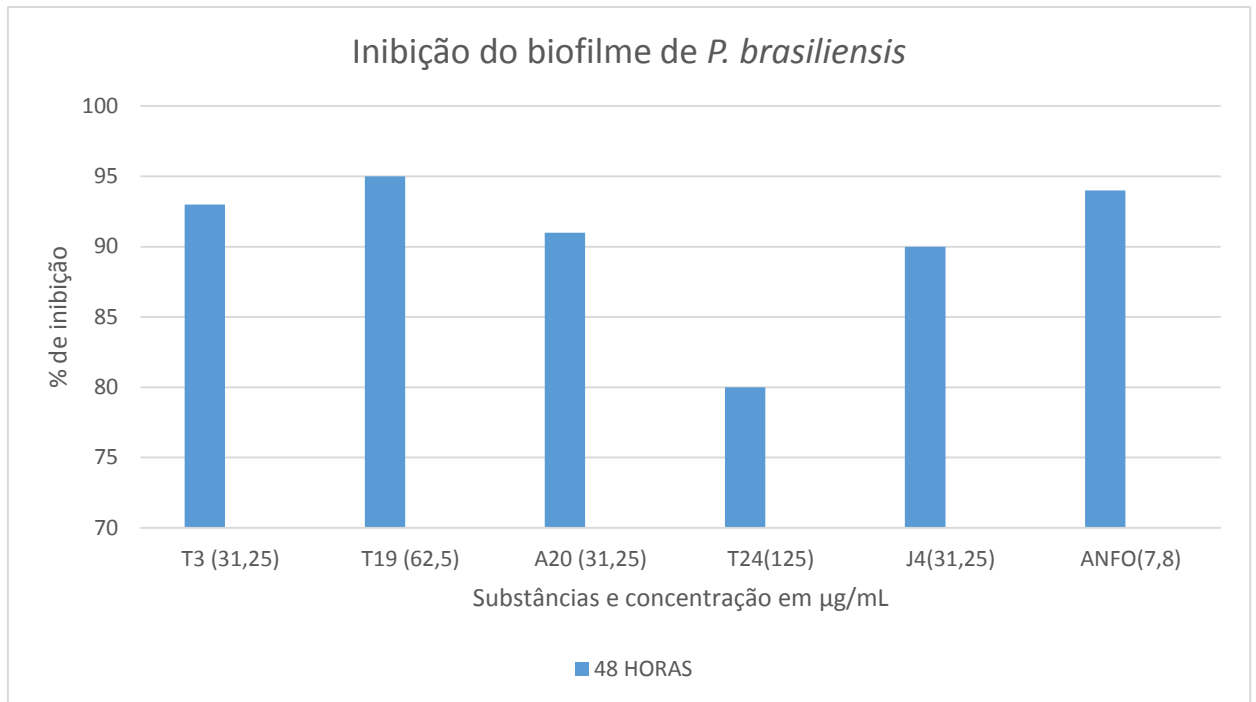


Figura 1. Resultado do percentual de inibição nas CIM das substâncias frente ao biofilme do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* após período de incubação de 48h.

4.3.2 – *H. capsulatum*

Nos experimentos realizados com biofilme de *H. capsulatum*, as substâncias iniciaram de concentração 500 µg/mL, e não foi observado concentração inibitória mínima de 90%. De acordo com os dados obtidos na leitura em espectrofotômetro a porcentagem de inibição na maior concentração (500µg/ml) variou de 50-70%.

Chalcona	CIB (µg/mL) 24 horas	CIB (µg/mL) 48 horas
T3	500	500
T19	500	500
A20	500	500
T24	500	500
J4	500	500
Cetoconazol	500	500

Tabela 5. CIB para biofilme da cepa EH315 de *H.capsulatum*.

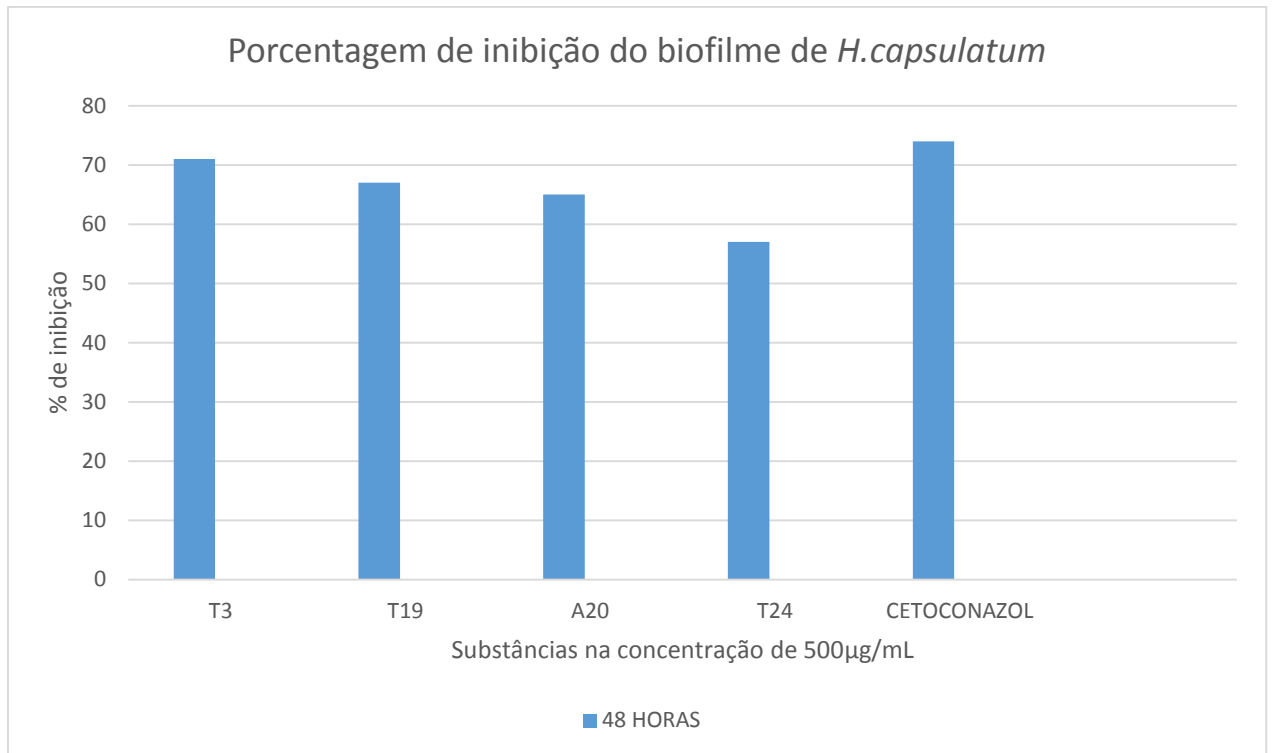


Figura 2. Resultado do percentual de inibição nas CIM das substâncias frente ao biofilme do isolado EH315 de *H. capsulatum* após período de incubação de 48h.

4.4.Citotoxicidade

A viabilidade celular aumenta em função da diminuição da concentração das substâncias. Na concentração de 125µg/mL temos a menor porcentagem de células viáveis. Nas concentrações de 0,97, 0,48, 0,24 e 0,12µg/mL observamos a maior porcentagem de células viáveis, como é mostrado na figura 3.

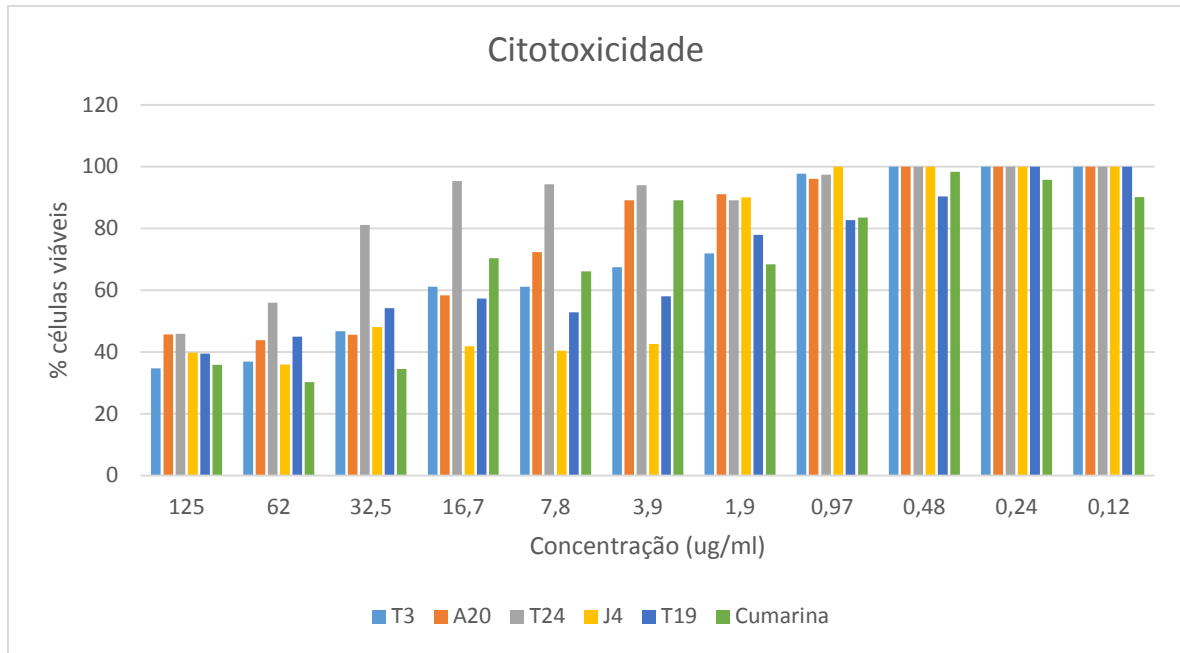


Figura 3. Porcentagem de células viáveis de acordo com a concentração das substâncias em $\mu\text{g/mL}$.

O índice de seletividade relaciona a IC_{50} da substância com a CIM_{90} obtida nos ensaios com a forma planctônica do fungo. Quanto maior o índice de seletividade de uma substância melhor é a sua performance pois significa que a substância em questão é mais seletiva para o fungo do que para as células estudadas, causando, portanto, menos danos a estas.

	T3	A20	T24	J4	T19
IC_{50}	36,9	35,62	136,19	4,58	68,8
IS Pb	76,9	74,20	140,40	4,72	70,92
IS Hc	18,73	4,56	4,35	0,14	8,82

Tabela 6. IC_{50} das substâncias e Índice de seletividade para *P.brasiliensis* cepa 18 e para *H.capsulatum* cepa EH315 em sua forma planctônica.

Também pode-se calcular o IS para biofilme, relacionando a IC_{50} com a CIB obtida nos ensaios com biofilme. Porém quando se trata de biofilme os valores do índice de seletividade obtidos são baixos como podemos observar na tabela abaixo.

	T3	A20	T24	J4	T19
IS Pb	1,18	1,13	1,08	0,14	1,10
IS Hc	0,073	0,071	0,272	0,009	0,137

Tabela 7. Índice de seletividade para biofilme de *P.brasiliensis* cepa 18 e para *H.capsulatum* cepa EH315

4.5 Análise estatística dos dados de citotoxicidade

A análise estatística foi feita utilizando o programa *GraphPad Prism*. Foi feito o teste de Bonferroni. A partir dos resultados obtivemos algumas diferenças estatísticas significantes entre as moléculas em suas diferentes concentrações:

T3 e A20 na concentração de 3,9µg/ml com $p < 0,01$;

T3 e T29 nas concentrações de 62, 32,5, 16,7 e 7,8µg/ml com $p < 0,001$ e na concentração 3,9µg/ml com $p < 0,05$;

T3 e J4 nas concentrações de 0,97, 0,48 e 0,24µg/ml com $p < 0,001$ e na concentração de 3,9 µg/ml com $p < 0,01$;

T3 e T19 nas concentrações de 3,9 e 0,97µg/ml com $p < 0,01$;

A20 e T24 nas concentrações 32,5 e 16,7µg/mL com $p < 0,001$, na concentração de 62µg/mL com $p < 0,01$ e na concentração de 7,8µg/mL com $p < 0,05$;

A20 e J4 nas concentrações 3,9, 0,97, 0,48 e 0,24µg/mL com $p < 0,001$ e na concentração de 7,8µg/mL com $p < 0,01$;

A20 e T19 nas concentrações 32,5 e 7,8µg/mL com $p < 0,05$, na concentração 1,9µg/mL com $p < 0,01$ e na concentração 3,9µg/mL com $p < 0,001$;

T24 e J4 nas concentrações 62, 32,5, 16,7 ; 7,8, 3,9 , 0,97, 0,48 e 0,24µg/mL com $p < 0,001$;

T24 e T19 nas concentrações 62, 16,7 ; 7,8 e 3,8 µg/mL com $p < 0,001$;

J4 e T19 nas concentrações 0,97, 0,48 e 0,24µg/mL com $p < 0,001$;

Quando comparadas com a droga controle Cumarina:

T24 apresentou diferença significativa nas concentrações 62 e 32,5µg/mL com valor de $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente;

A J4 e T19 apresentaram diferença na concentração de 3,9µg/mL com valor de $p < 0,001$;

A J4 também apresentou diferença nas concentrações de 0,97, 0,48 e 0,24µg/mL com $p < 0,0001$;

A T19 apresentou diferença na concentração de 0,12µg/mL com $p < 0,05$.

4.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As figuras a seguir mostram fotomicrografias em microscopia eletrônica de varredura do controle positivo (não tratado) do biofilme do isolado Pb18 de *P.brasiliensis* com formação de 24 horas e do biofilme de Pb18 tratado com a chalcona T3 durante 48 horas. As duas fotos foram realizadas partindo de um mesmo experimento. Pode-se observar na fotomicrografia do controle positivo que em 24 horas de formação já existe um biofilme bem organizado e com grande número de células.

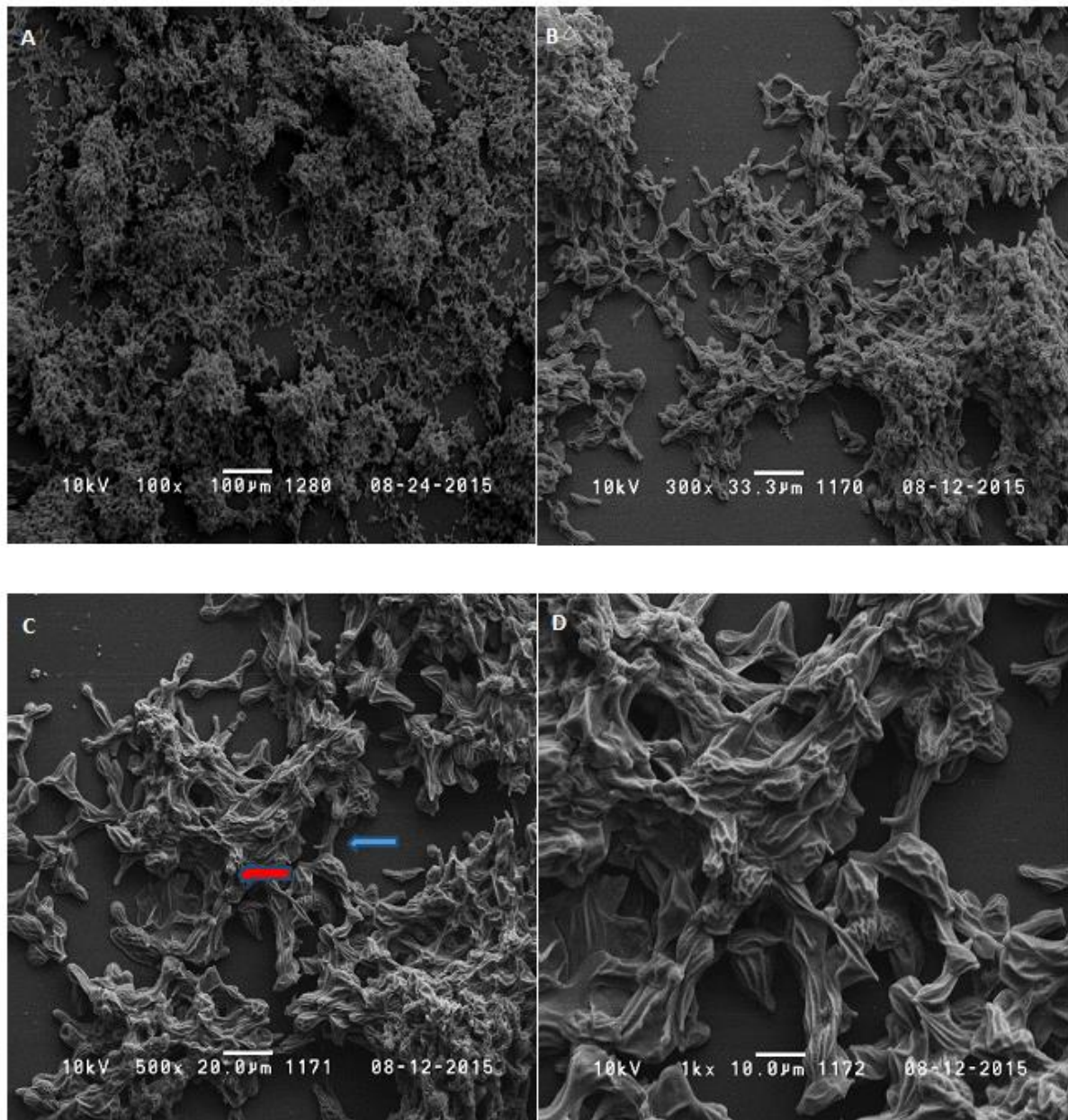


Figura 4. Fotomicrografia MEV (microscopia eletrônica de varredura) do controle positivo (sem tratamento) do biofilme de *P. brasiliensis* (cepa18) com 24h de formação. As setas na foto C indicam a existência de uma possível matriz (seta azul) e leveduras (seta vermelha).

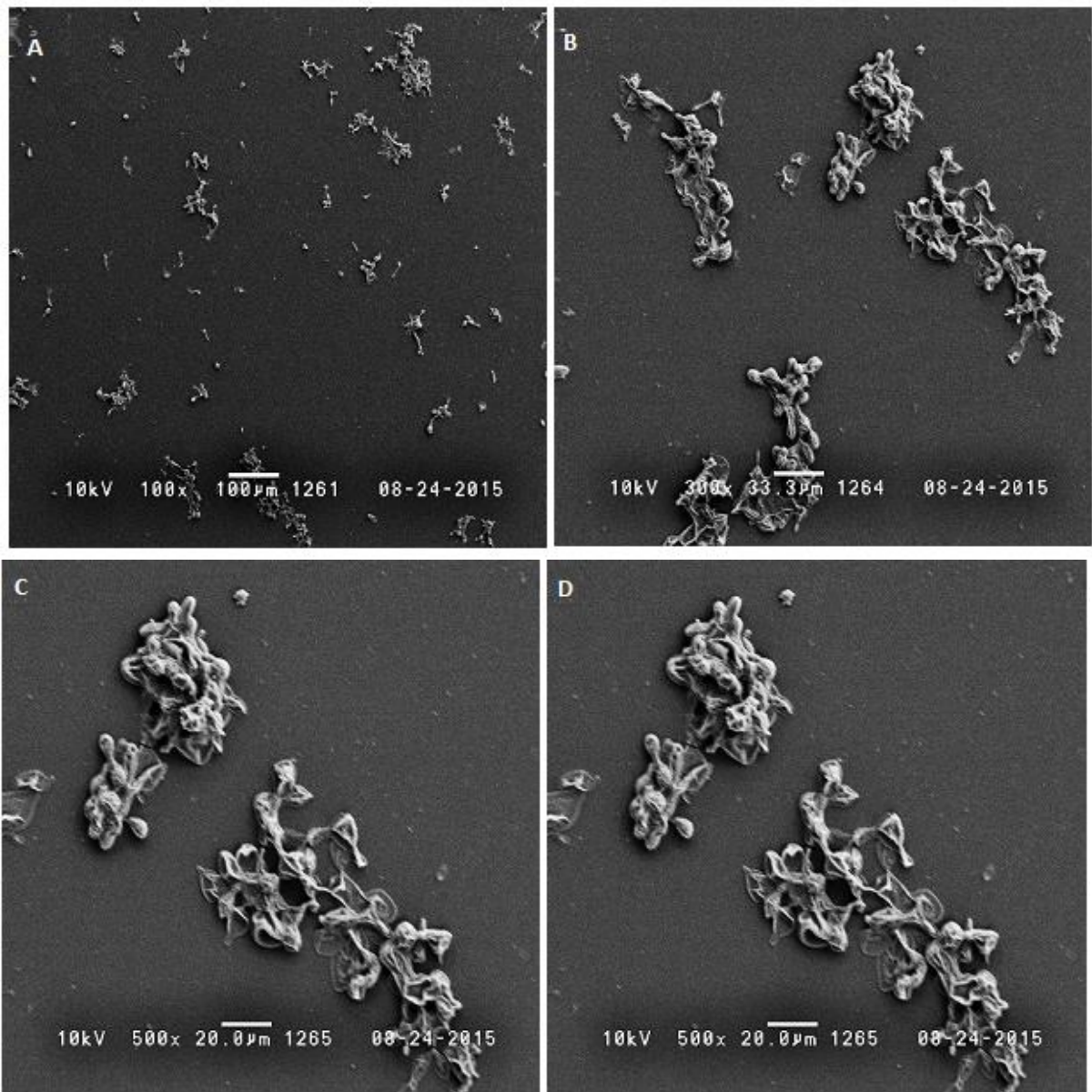


Figura 5. Fotomicrografia (MEV) microscopia eletrônica de varredura do biofilme do isolado de Pb18 de *P.brasiliensis* tratado com 31,25µg/mL da substância chalcona T3 durante 48 horas de tratamento.

5. DISCUSSÃO

Diante da necessidade em diminuir o número de infecções fúngicas invasivas, como as infecções causadas pelo *P. brasiliensis* e *H. capsulatum* e também da necessidade de desenvolver novos medicamentos antifúngicos, menos tóxicos ao organismo humano, iniciamos o estudo de substâncias derivadas de chalconas no combate ao *P. brasiliensis* e *H. capsulatum*.

Inicialmente diversas chalconas foram testadas contra a forma planctônica dos dois fungos e foi feita uma triagem das melhores moléculas, para que então, estas fossem testadas contra a forma de biofilme. Os resultados, durante o teste com concentração inibitória mínima contra a forma planctônica, foram satisfatórios pois obtivemos moléculas que, em baixas concentrações, se mostraram ativas contra os fungos, apresentando uma CIM₉₀ satisfatória sendo portanto capazes de inibir o crescimento de 90% dos fungos.

Dentre as moléculas testadas, as que forneceram melhores resultados para ambos os fungos foram as T3, A20, J4, T24 e T19. Nos ensaios realizados contra o *P. brasiliensis* com estas substâncias as concentrações inibitórias mínimas variaram de 0,48 a 0,97 µg/mL. Para o *H. capsulatum* as concentrações inibitórias mínimas variaram de 1,97 a 32 µg/mL respectivamente.

Na literatura existe o estudo da substância Miltefosina (MIL) contra diversas cepas de *H. capsulatum* em sua forma leveduriforme e miceliar. Os resultados obtidos contra a forma miceliar variaram de 0,25 a 2 µg/mL e contra a forma leveduriforme de 0,125 a 1 µg/mL. Nestes valores ocorreu uma inibição de 80% do crescimento fúngico (Brilhante, 2014). Neste trabalho nós obtivemos uma substância capaz de inibir 90% do crescimento com concentração de 1,97 µg/mL.

Existe também um estudo com galatos contra *P. brasiliensis*, neste estudo a CIM contra o isolado Pb18 variou de 0,004 µg/mL a 15,625 µg/mL. As IC₅₀ dos galatos que apresentaram menores valores de CIM variaram entre 0,500 e 0,600 µg/mL e o seu índice de seletividade variou de 30 a 135 (DE PAULA E SIVA, 2012). Apesar de alguns dos galatos apresentarem uma menor CIM quando comparados às chalconas estudadas nós podemos inferir que as chalconas são mais seletivas pois no geral apresentaram maiores valores de índice de seletividade.

Em relação às chalconas, existe um estudo na literatura no qual se testa a atividade de aminochalconas LVQM contra *P. brasiliensis*. Neste projeto a CIM₉₀ encontrada variou de 0,49 a 125µg/mL. Foi feito também um estudo com análogos arílicos de aminochalconas, neste caso a CIM₉₀ variou de 1,95 a 125µg/mL (SANTOS, 2015). Analisando este estudo podemos inferir que as nossas chalconas se mostraram mais potentes que algumas aminochalconas e que todos os derivados arílicos estudados neste estudo citado, pois as nossas moléculas apresentaram menores concentrações inibitórias mínimas.

O controle do fármaco utilizado no ensaio com o *P. brasiliensis* foi a Anfotericina B, sua CIM₉₀ foi de 0,12µg/mL. Quando comparamos com os resultados obtidos podemos inferir que as chalconas testadas não são tão potentes quanto a Anfotericina B, porém ainda sim são promissoras pois foram eficazes contra o fungo e menos tóxicas na CIM e podem ser uma alternativa.

No ensaio com o *H. capsulatum* as chalconas se mostraram menos ativas do que nos ensaios com o *P. brasiliensis*, apresentando maiores valores de concentrações inibitórias mínimas. Entretanto estes valores de CIM estão longe dos valores de citotoxicidade. Essa diferença pode ser devido à maior capacidade de se multiplicar do *H. capsulatum* quando comparado ao *P. brasiliensis* (SARDI et al., 2015).

O biofilme fúngico é um importante fator de virulência e resistência dos fungos pois caracteriza uma comunidade de microrganismos associados e firmemente aderidos a uma superfície por meio de uma matriz extracelular de polímeros. Esta forma de organização os tornam mais resistentes à estresses físico químicos e biológicos.

Já foi demonstrado em estudos que o *P. brasiliensis* e o *H. capsulatum* possuem a capacidade de formar biofilme e aderir às células epiteliais (SARDI et al, 2015; PITANGUI et al, 2012). Diante disso, testamos as chalconas que obtiveram melhores resultados durante os ensaios com a forma planctônica dos fungos, em biofilmes em formação dos dois fungos. Estas moléculas mostram-se de amplo espectro para os fungos dimórficos aqui estudados.

Para o biofilme de *P. brasiliensis* as substâncias que apresentaram menores concentrações inibitórias mínimas foram a T3, A20 e J4 com CIM₉₀ de 31,25µg/mL, enquanto que para a droga controle, Anfotericina B o resultado foi de 7,8µg/mL. A T19 apresentou um CIM₉₀ de 62,5µg/mL e a T24 125µg/mL.

Para o biofilme de *H.capsulatum* infelizmente não obtivemos resultados satisfatórios pois, não foi encontrado um valor de CIM₉₀ para nenhuma das substâncias. Porém encontramos que a chalcona T3 inibe até 70% do biofilme em concentração de 500µg/mL.

Já era esperado que o *H. capsulatum* fosse mais resistente às chalconas diante dos valores de CIM₉₀ obtidos nas concentrações planctônicas. Além disso, sabe-se que este fungo é mais virulento pois exibe um potencial de invasão maior, que se inicia após 1 hora de infecção, quando comparado a outros fungos patogênicos como *C. albicans* e *P. brasiliensis*, que invadem após 4 e 5 horas de infecção, respectivamente (PITANGUI et al, 2012).

Em nosso grupo foram realizados estudos com protocatecuatos, que apresentaram valores de CIM₉₀ contra *H. capsulatum* em sua forma planctônica semelhantes com as chalconas em questão, e que infelizmente, também não apresentaram alta atividade contra seu biofilme em formação. Apenas o protocatecuato de nonila apresentou CIM₈₀ de 7,81µg/mL, nos outros protocatecuatos estudados não foram observadas CIM₉₀, CIM₈₀ e CIM₅₀ (ROSINHA, 2013)

Para avaliar a eficiência e segurança das chalconas é necessário avaliar a concentração terapêuticas em que se tornam tóxicas ao organismo humano, pois assim pode-se analisar se é possível utilizá-las para tratamento de biofilme fúngico sem que haja toxicidade para o paciente.

Durante os testes de citotoxicidade obtivemos que as substâncias T3, A20, T24 e T19 apresentaram resultados satisfatórios apresentando um valor de IC₅₀ bem distante das concentrações terapêuticas. Além disso, o índice de seletividade da maioria das moléculas ficou em torno de 70 a 140. Lembrando que valores ≥ 10 mostram seletividade adequada do fármaco.

Diante destes dados podemos inferir que estas substâncias possuem uma CIM e CIB (no caso do PB18) satisfatórias pois estão abaixo do valor citotóxico, além disso possuem um alto valor de seletividade para os fungos em sua forma planctônica, indicando que possui mais afinidade pelas células fúngicas do que pelos fibroblastos do pulmão.

A substância J4 não apresentou grande viabilidade celular, seu valor de IC₅₀ foi de 4,58µg/mL indicando que é inviável a utilização de 31,25µg/mL para tratamento de biofilme, pois neste valor a substância possui alta toxicidade. O seu índice de seletividade foi de 4,72 para Pb18, o menor dentre as moléculas testadas.

Porém, ainda é possível melhorar a viabilidade celular e o índice de seletividade, principalmente para a forma de biofilme que é a que apresentou índices menores que 10, através da modificação molecular ou um sistema de liberação de fármaco nanoestruturado, o que também poderia diminuir os efeitos colaterais, direcionar o fármaco para sítios específicos, e liberar o fármaco de maneira controlada (LUZ G.M.,2011)

Além disso há relatos da interação sinérgica entre duas ou mais substâncias naturais sobre os microrganismos, como na associação dos óleos essenciais de cravo e canela, capaz de inibir o crescimento de fungos importantes na deterioração de uvas e outros alimentos, como *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus niger* e *Alternaria alternata*. (SUKATTA et al., 2088). Este fato leva à idéia de testar essas chalconas associadas à elementos naturais, como alternativa, pois talvez ocorra um sinergismo que leve a resultados mais satisfatórios, como menores concentrações das substâncias e menor toxicidade.

Diante de todos os dados, a substância T3 foi a que teve menor CIM₉₀ para tratamento de biofilme de *P. brasiliensis* cepa18, apresentou inibição de 70% do biofilme de *H.capsulatum*, possui um IS favorável tanto para *P. brasiliensis*, quanto para *H.capsulatum* e possui os melhores valores de CIM90 contra forma planctônica dos dois fungos, portanto pode ser considerada e melhor substância entre as chalconas analisadas.

A partir destes resultados a chalcona T3 demonstrou ser uma substância promissora, que pode vir a se tornar um novo fármaco antifúngico futuramente. Estudos acerca dos mecanismos de ação, bem como de sua formulação serão necessários para o desenvolvimento de um novo fármaco antifúngico com espectro contra as espécies de fungos dimórficos estudadas aqui.

Nosso estudo contribuiu para o início do desenvolvimento de um novo protótipo antifúngico. Outras espécies deveriam ser testadas para verificar a capacidade espectral deste protótipo.

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos é possível inferir que as chalconas estudadas são moléculas promissoras no combate à forma planctônica e ao biofilme de *P.brasiliensis*, no combate à forma planctônica do *H.capsulatum* e que, com algumas melhorias, podem se tornar mais eficientes contra o biofilme de Hc. Estas substâncias possuem diferentes níveis de atividade frente aos fungos dimórficos em questão e podem vir a ser uma alternativa de tratamento ou um tratamento coadjuvante nos casos de infecções fúngicas invasivas. Vale também ressaltar que as chalconas são encontradas em fontes naturais, como plantas e flores comestíveis sendo, portanto, extraídas de fontes seguras. Como neste estudo conseguimos resultados favoráveis em relação ao *H.capsulatum* em sua forma planctônica, um estudo com estas chalconas associadas a outros elementos antifúngicos pode ser feito, para que um melhor resultado contra biofilme de *H.capsulatum* seja alcançado. Em relação ao *P.brasiliensis* obtivemos resultados animadores, pois temos substâncias muito eficazes e que proporcionaram uma viabilidade celular de até 80%. A pesquisa com estas promissoras moléculas deve continuar afim de diminuir ao máximo a toxicidade destas moléculas e aumentar o seu índice de seletividade principalmente em relação ao biofilme. Este trabalho foi de grande importância pois elucidou um pouco mais o espectro de ação das chalconas frente a esses fungos dimórficos, principalmente da chalcona T3, que se mostrou a melhor dentre todas as moléculas pesquisadas e que deve portanto continuar a ser estudada para que, futuramente, possa se tornar um novo fármaco antifúngico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-FATTANI, M. A.; DOUGLAS, L. J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. **J Med Microbiol**, v. 55, n. Pt 8, p. 999-1008, 2006.

AIDÉ, M. A. Chapter 4--histoplasmosis. **J Bras Pneumol**, v. 35, n. 11, p. 1145-51, 2009.

AJELLO, L. Italian contributions to the history of general and medical mycology. **Med Mycol**, v. 36 Suppl 1, p. 1-11, 1998.

ALARCÓN, K.P.M ; Marlus Chorilli ; Marlus Chorilli ; DUTRA, L. ; SARDI, J. C. O. ; BENTO, P. ; , Fusco-Almeida, A.M ; REGASINI, L. O. ; BOLZANI, V. S. ; Silva, D.H.S ; MENDES-GIANNINI, M. J. S. . PROCESSO DE OBTENÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO DE NANOESTRUTURA LIPÍDICA, COMPOSIÇÃO DE NANOESTRUTURA LIPÍDICA E USO DA MESMA. 2015, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020150046618, data de depósito: 03/03/2015, título: "PROCESSO DE OBTENÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO DE NANOESTRUTURA LIPÍDICA, COMPOSIÇÃO DE NANOESTRUTURA LIPÍDICA E USO DA MESMA", Instituição de registro:INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

BERGOLD AM, GEORGIADIS S, Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão, 2004.

BITTENCOURT, J. I. M.; OLIVEIRA, R. M.; COUTINHO, Z. F. Paracoccidiodomycosis in the State of Paraná, Brazil, 1980/1998. **Cad. Saúde Pública**, v. 21, n. 6, p. 1856-1864, 2005.

Brilhante RS; Malaquias AD; Caetano EP; Castelo-Brancode S; Lima RA; Marques FJ; Silva NF; Alencar LP, Monteiro AJ; Camargo ZP; Bandeira de J; Rodrigues AM; Cordeiro R de A; Moreira JL; Sidrim JJ; Rocha MF; In vitro inhibitory effect of miltefosine against strains of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* and *Sporothrix* spp, Specialized Medical Mycology Center, Federal University of Ceará, 2014.

BRUXEL, F.; LAUX, M.; WILD, L.B.; FRAGA, M.; KOESTER, L. S.; TEIXEIRA, H. F. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1827-1840, 2012. CLINICAL LABORATORY STANDARD INSTITUTE, M27-A2, 2002.

CASTRO, L.A.S; Processamento de amostras para Microscopia eletrônica de varredura, Pelotas RS, 2002.

DE PAULA E SILVA AC, OLIVEIRA HC, SILVA JF, SANGALLI-LEITE F, SCORZONI L, FUSCO-ALMEIDA AM, MENDES-GIANNINI MJ. Microplate alamarBlue assay for *Paracoccidioides* susceptibility testing. **J Clin Microbiol**. v.51, n.4:1250-2, 2013.

FAVA NETTO, C. Contribuição para o estudo imunológico da blastomicose de Lutz (*Blastomicosesulamericana*). São Paulo: **Rev. Inst. A. Lutz**. 21: 99-194 p. 1961.

ELLS TC, Truelstrup Hansen L. Strain and growth temperature influence *Listeria* spp. attachment to intact and cut cabbage. **Int J Food Microbiol**. v, 15;111,n. 1, p. 34-42, 2006.

LUZ GM, Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados estabilizados com álcool cetílico etoxilado e propoxilado para administração cutânea de itraconazol, Faculdade de ciências farmacêuticas, Araraquara, 2011.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Specific antibody can prevent fungal biofilm formation and this effect correlates with protective efficacy. **Infect Immun**, v. 73, n. 10, p. 6350-62, 2005.

MORRIS CE, MONIER J, JACQUES M. Methods for observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganisms. **Appl Environ Microbiol.** v. 63 n. 4, p. 1570-6, 1997.

NASCIMENTO ACMOB; Susceptibilidade antifúngica, produção de biofilme e caracterização do gene ALS3 em isolados de *Candida Albicans* e não-albicans do hospital das clínicas, unesp, Botucatu, 2009.

NEOFYTOS D, LU K, HATFIELD-SEUNG A, BLACKFORD A, MARR KA, TREADWAY S, OSTRANDER D, NUSSENBLATT V, KARP J. Epidemiology, outcomes, and risk factors of invasive fungal infections in adult patients with acute myelogenous leukemia after induction chemotherapy. **Diagn Microbiol Infect Dis.** v.75 n. 2, p. 144-9, 2013.

PITANGUI NS, SARDI JC, SILVA JF, BENADUCCI T, MORAES DA SILVA RA, RODRÍGUEZ-ARELLANES G, TAYLOR ML, MENDES-GIANNINI MJ, FUSCO-ALMEIDA AM. Adhesion of *Histoplasma capsulatum* to pneumocytes and biofilm formation on an abiotic surface. **Biofouling**;v. 28, n. 7, p. 711-8, 2012

PITANGUI NS; Análise proteômica diferencial do biofilme de *Histoplasma capsulatum* e implicações na interação fungo-hospedeiro; Araraquara 2012; 27F. Dissertação (mestrado) Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

ROSINHA M Y; Desenvolvimento de protótipos antifúngicos contra biofilmes de *Histoplasma capsulatum*, 58f, 2013.

SANTOS, Mariana Bastos dos. Síntese de aminochalconas e análogos arílicos como agentes antivirais, antifúngicos e inibidores de mieloperoxidase. 2015. 140 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2015.

SARDI JC, SCORZONI L, BERNARDI T, FUSCO-ALMEIDA AM, MENDES GIANNINI MJ. CANDIDA SPECIES: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **J Med Microbiol**.v. 62,n. 1, p. 10-24, 2013.

SHIKANAI-YASUDA MP, FILHO FQT, MENDES RP, COLOMBO AL, MORETTIM L; Consenso em paracoccidioidomicose, Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2006.

SILVA, Ana Carolina Alves de Paula e. Avaliação por métodos fenotípicos e proteômicos de galatos de alquila com atividade anti-complexo Paracoccidioides. 2012. 107 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2012.

ZAGO, J.A.A.; USHIMARU, P.I.; BARBOSA, L.N.; FERNANDES JUNIOR, A. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. Revista Brasileira de 57 Farmacognosia., v.19, n.4, p. 828-833. Out/Dez., 2009.

De acordo,

Araraquara, 07 de Janeiro de 2016.

Iara Pengo Tobias da Silva
(Orientanda)

Ana Marisa Fusco Almeida
(Orientadora)