



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

LUCIANA ARANTES SOARES

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIDERMATOFÍTICA DE
PROTOCATECUATOS CONTRA *T. rubrum* E

T. interdigitale

ARARAQUARA-SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

LUCIANA ARANTES SOARES

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIDERMATOFÍTICA DE
PROTOCATECUATOS CONTRA *T. rubrum* E**

T. interdigitale

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Concentração: Micologia.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida

ARARAQUARA-SP

2011

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

S676p Soares, Luciana Arantes
Estudo da atividade antidermatofítica de Protocatecuatos contra *T. rubrum* e *T. interdigitale*. / Luciana Arantes Soares – Araraquara, 2011.
85 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia
Orientadora: Ana Marisa Fusco Almeida

1. Antifúngicos. 2. Ácido protocatecuico. 3. Trichophyton. 4. Sinergismo.
5. Proteômica. 6. Eletroforese bidimensional. I. Almeida, Ana Marisa Fusco, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/SP-UNESP. Recebeu apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES).

“O que também aprendestes, e recebestes, e ouvistes, e vistes em mim, isso praticai; e o Deus de paz será convosco. Ora, muito me regozijo no Senhor por terdes finalmente renovado o vosso cuidado para comigo; do qual na verdade andáveis lembrados, mas vos faltava oportunidade. Não digo isto por causa de necessidade, porque já aprendi a contentar-me com as circunstâncias em que me encontre. Sei passar falta, e sei também ter abundância; em toda maneira e em todas as coisas estou experimentado, tanto em ter fartura, como em passar fome; tanto em ter abundância, como em padecer necessidade. Posso todas as coisas naquele que me fortalece.”

(Filipenses 4:9-13)

Dê sempre o melhor e o melhor virá...

*Às vezes as pessoas são egocêntricas, ilógicas e insensatas...
Perdoe-as assim mesmo.*

*Se você é gentil, as pessoas podem acusá-lo de egoísta e interesseiro...
Seja assim mesmo.*

*Se você é um vencedor, terá alguns falsos amigos e alguns inimigos verdadeiros...
Vença assim mesmo.*

*O que você levou anos para construir, alguém pode destruir de uma hora para
outra...
Construa assim mesmo.*

*Se você tem paz e é feliz, as pessoas podem sentir inveja...
Seja feliz assim mesmo.*

*O bem que você faz hoje, pode ser esquecido amanhã...
Faça o bem assim mesmo.*

*Dê ao mundo o melhor de você. Mas isso pode nunca ser o bastante...
Dê o melhor de você assim mesmo*

*E veja você que, no final das contas...
É entre você e Deus...
Nunca foi entre você e eles!*

(MADRE TEREZA DE CALCUTÁ)

*Dedico este trabalho
Aos meus pais, Sebastião e Adélia,
às minhas irmãs Fernanda e Maria,
minha eterna gratidão e reconhecimento de que os méritos desta conquista
a muito da presença de vocês.*

Agradecimentos

Costumo dizer que minha formação acadêmica é construída com tudo que venho colocando na minha bagagem durante a vida. Entre vários professores que tive na graduação, uma parte importante do conteúdo desta bagagem vem do Professor Hindenburg Cruvinel que tive o prazer de conhecer, estudar e admirar durante a graduação. Obrigado pela força, pelo querer bem e por ter me incentivado a ingressar na pós-graduação.

Ao Professor Dr. Pizzolito agradeço pelo incentivo, desde o momento que esta etapa era apenas uma vontade. Obrigado por ter me apresentado a professora Dra. Maria José que é um exemplo de pessoa a ser seguido.

Agradeço a Professora Dra. Maria José por ter aberto as portas do seu laboratório e, sem me conhecer, ter “apostado” em mim e ter permitido a minha integração no seu grupo. Obrigado pelos seus ensinamentos transmitidos de sua experiência em pesquisa e ensino.

À Professora Dra. Ana Marisa Fusco, por me aceitar como sua orientanda, pelos seus ensinamentos, pela sua correta orientação e por sua disponibilidade irrestrita.

Por seus ensinamentos inspiradores, expresso a minha gratidão ao Professor Dr. Luís Octávio, por ter partilhado conhecimentos e sugestões na banca de qualificação, produção do artigo científico e por ter aceitado o convite para compor a banca de defesa.

Meus agradecimentos dirigem-se ainda a Professora Dra. Ana Fachin da Unaerp, pelas sugestões na banca de qualificação e por ter disponibilizado linhagem de fungo utilizada neste trabalho.

Ao Instituto de Química-UNESP e aos professores integrantes do Projeto Temático Biota/Bioprospecta- Fapesp, pela contribuição para o desenvolvimento desse estudo.

Ao Professor Dr. Anderson da UFTM, por toda sua atenção, e por ter aceitado o convite para compor a bancada de avaliação deste trabalho.

Aos queridos companheiros de bancada do Laboratório de Micologia (sem qualquer ordem) Liliana, Fernanda Sangalli, Fernanda Gullo, Janaína, Haroldo, Suélen, Caroline (Panta), Caroline (Tatto), Tatiane, Jaqueline, Danielle, Natália, Aline, Kayla, Claudete, Nayla, Julhiany, Thais, Warley, Patrícia (Laranja), Carol (de BH), Sr. Torres e Valter, por dividimos esforços na conquista de mais uma etapa de vida.

À Rosângela técnica do Laboratório de Micologia, pela colaboração e organização do laboratório durante a realização da dissertação.

Ao Marcelo Teruyuki, por ser uma pessoa que admiro muito.

À Elaine técnica do Laboratório de Microbiologia, pelo carinho, pela enorme simpatia com que sempre me tratou.

Aos colegas dos laboratórios de Imunologia, Citologia e Bioquímica, obrigada pela convivência e aprendizado diário.

Ao pessoal da Pós-Graduação: Cláudia, Sônia, Laura, Ângela, Márcia e Joyce pelo apoio técnico para a realização deste trabalho. Ainda agradeço pessoas da segurança, compras, gestão, limpeza, biblioteca e manutenção informática pelo apoio e serviços prestados.

A todos os professores do Programa de Biociências e biotecnologia, que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento profissional.

À FCF- UNESP e Capes pelo apoio financeiro e institucional para a realização deste trabalho.

Às minhas amigas de república, segunda família (sem qualquer ordem) Larissa, Dayene, Tatiane, Jéssica e Renata obrigada pela companhia, por terem me fornecido apoio e encorajamento nos momentos bons e nos mais difíceis, por estarem sempre presentes com sua amizade.

Agradeço à minha família em especial, aos meus pais, que sempre me orientaram e empurraram no melhor sentido. Todas as palavras do mundo são poucas para expressar o meu reconhecimento e gratidão por isso, digo simplesmente OBRIGADA... Obrigada por terem feito de mim o que sou.

Expresso a minha profunda gratidão às minhas irmãs Fernanda e Maria. Agradeço o apoio demonstrado, os incentivos constantes e as críticas construtivas que me dirigiram (e continuaram a dirigir) ao longo da vida.

À minha querida Tia Ana Palmira e ao meu querido Tio Augusto César, exemplos de força e fé... obrigada pelo apoio e pelo incentivo, e ainda por fazerem parte da minha vida compartilhando momentos importantes.

Ao meu namorado Emerson e minha sogra Andreia, pelo apoio e carinho, agradeço a Deus por ter-me dado a graça de tê-los ao meu lado nesta jornada.

A Deus, cuja força sempre senti ao meu lado.

Todos os valores nos quais acredito, aprendi durante o convívio com muitas pessoas. Algumas delas apenas passaram pela minha vida e logo se foram, algumas outras foram tão importantes que sempre terão um espaço reservado em minhas boas lembranças, algumas outras seguem e seguirão comigo, mas todas serão únicas.

Ninguém é capaz de realizar seus sonhos por si só...
Ninguém é capaz de viver sozinho!

Que Deus abençoe a todos!

Acabo fazendo minhas as palavras as de pensador Sêneca:

“Quem acolhe um benefício com gratidão, paga a primeira prestação da sua dívida”

Obrigada a todos!

ORAÇÃO DA SERENIDADE

***“CONCEDEI-ME SENHOR A **SERENIDADE** NECESSÁRIA PARA ACEITAR
AS COISAS QUE NÃO POSSO MODIFICAR.
CORAGEM PARA MODIFICAR AQUELAS QUE POSSO E **SABEDORIA**
PARA DISTINGUIR UMAS DAS OUTRAS”***

(Reinhold Niebuhr)

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. Produtos naturais e síntese de novos compostos.....	20
1.2. Atividades de Ésteres do Ácido Protocatecuico	21
1.3. Dermatofitoses	22
1.3.1. Epidemiologia	24
1.3.2. Tratamento	26
1.3.3. Resistência.....	27
1.4. Ensaio de sensibilidade	28
1.5. Sinergismo	29
1.6. Proteômica	30
2. JUSTIFICATIVA	32
3. OBJETIVOS	33
3.1. Objetivos gerais	33
3.2. Objetivos Específicos	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1. Obtenção dos compostos (1-16)	34
4.1.1. Síntese dos protocatuatos (2-15).....	34
4.1.2. Síntese do ácido 3,4 – diacetoxibenzoico (16).....	34
4.1.3. Diluição dos compostos	35
4.2. Cultivo dos dermatófitos.....	35
4.3. Preparo do inóculo	36
4.4. Avaliação da suscetibilidade de dermatófitos aos antifúngicos pela técnica de microdiluição	36
4.5. Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	37
4.6. Avaliações das Associações.....	38
4.6.1. Método do tabuleiro de xadrez.....	38
4.6.2. Associação equimolar	40
4.7. Tratamento das células fúngicas e extração de proteínas	40
4.7.1. Doseamento protéico.....	41
4.7.2. Análise do perfil protéico por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	41
4.7.3. Eletroforese Bidimensional	41
4.7.3.1. Focalização Isoelétrica (Primeira dimensão).....	41
4.7.3.2. Preparo da amostra	42
4.7.3.3. SDS-PAGE (Segunda dimensão)	42
4.7.4. Revelação do gel pelo azul de Comassie	43
4.8. Teste de citotoxicidade - MTT	43
5. RESULTADOS	44
5.1. Avaliação da atividade antifúngica dos compostos sintéticos esterificados.....	44
5.1.1. Avaliação da atividade antifúngica dos compostos sintéticos esterificados	45
5.2. Avaliação da atividade combinatória de fluconazol e protocatuatos	49
5.3. Avaliação da atividade combinatória de griseofulvina e protocatuato de nonila... 51	
5.4. Avaliação da atividade antifúngica da combinação equimolar de miconazol e protocatuatos	52
5.4.1. Avaliação da atividade antifúngica da combinação equimolar de miconazol e protocatuatos	53

5.5. Avaliação da atividade antifúngica da combinação equimolar de nistatina e protocatecuatos	54
5.6. Resultados do ensaio de citotoxicidade dos protocatecuatos de pentila, hexila, heptila, octila e nonila.....	56
5.7. Resultados da avaliação do proteoma total e diferencial de <i>T. rubrum</i> nas situações de contato com as substâncias antifúngicas.....	57
5.7.1. Análise do perfil protéico por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) dos extratos proteicos totais de <i>T. rubrum</i>	57
5.8. Análise do proteoma total de <i>T. rubrum</i> (Tm1) por eletroforese bidimensional dos géis controle (Tm1 sem contato com substância antifúngica) e Tm1 tratado com terbinafina	58
5.9. Análise do perfil diferencial do controle (Tm1 sem contato com substância antifúngica) e Tm1 tratado com terbinafina	62
5.10. Análise protéica por eletroforese bidimensional controle (Tm1 sem contato com substância antifúngica) e Tm1 tratado com protocatecuato de nonila.....	64
5.11. Análise do perfil diferencial do gel controle e gel tratado com nonila	68
6. DISCUSSÃO	69
7. CONCLUSÕES	74
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tabela representativa contendo o cálculo do coeficiente de partição, a CIM e CFM dos protocatecuatos frente aos seis isolados	45
Tabela 2. Concentração inibitória mínima <i>In vitro</i> (CIM%) e concentração fungicida mínima (% CFM) do ácido protocatecuico e seus ésteres para Tr1 , Tr2 e Tr3	46
Tabela 3. Concentração inibitória mínima <i>In vitro</i> (CIM%) e concentração fungicida mínima (CFM%) do ácido protocatecuico e seus ésteres para Tm1 , Tm2 e Tm3 .	46
Tabela 4. Atividade de fluconazol combinado com os protocatecuatos de pentila (7), hexila (8), heptila (9), octila (10) e nonila (11) contra cepas de dermatófitos ($\mu\text{g/mL}$)	50
Tabela 5. Valores de CIM da griseofulvina e do derivado nonila testados por uso simples e combinados contra os isolados de dermatófitos. O índice combinado fracionado (ICIF) das duas substâncias também está representado na tabela	51
Tabela 6 - Atividade <i>in vitro</i> da combinação de miconazol com protocatecuatos de pentila (PEN), hexila (HEX), heptila (HEP), nonila (NON), dodecila (DOD), tetradecila (TET), hexadecila (HEX) e octadecila (OCT) contra três linhagens de dermatófitos ($\mu\text{g/ml}$)	53
Tabela 7. Atividade <i>in vitro</i> de nistatina com protocatecuato de pentila (PENT), Hexila (HEX), heptila (HEP), nonila (NON), dodecila (DOD), tetradecila (TET), hexadecila (HEX) e octadecila (OCT) contra três linhagens de dermatófitos ($\mu\text{g/mL}$)	55
Tabela 8. Avaliação da atividade citotóxica em macrófagos alveolares e índice de seletividade a partir da relação entre o CI_{50} e CFM	56
Tabela 9. Proteínas demonstradas na figura 7 com seus respectivos pontos isoeletricos (pI), massas moleculares (MM) e alterações observadas com o tratamento com terbinafina	62
Tabela 10. Proteínas demonstradas na figura 10 com seus respectivos pontos isoeletricos (pI), massas moleculares (MM) e alterações observadas com o tratamento com nonila	68

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estruturas químicas do ácido protocatecuico (1) e seus ésteres (2-16) 22
- Figura 2.** Exemplo de esquema de combinação de compostos na placa de microdiluição de 96 poços. Teste combinatório com griseofulvina (em negrito) e protocatecuato de nonila (em itálico). C-: Controle Negativo; C+: Controle Positivo. * CIM e *CIM* concentração inibitória mínima de griseofulvina e do protocatecuato de nonila, respectivamente 39
- Figura 3.** Valores de CIM e CFM dos protocatecuatos contra duas espécies de *Trichophyton* 48
- Figura 4.** Componentes totais de Tr1 (1), Tm3 (2), Tr1 sem tratamento (3) e Tr1 tratado com nonila 10x (4) 57
- Figura 5.** Eletroforese bidimensional dos componentes protéicos totais de *T. rubrum* na faixa de pH de 3 a 10 sem tratamento. Gel corado pelo azul de Coomassie 59
- Figura 6.** Eletroforese bidimensional dos componentes protéicos totais de *T. rubrum* tratado com terbinafina 50 x acima da CIM. Gel corado pelo azul de Coomassie 60
- Figura 7.** Eletroforese bidimensional do extrato protéico total de *T. rubrum* isolado clínico na faixa de pH de 3 a 10, comparada com *T. rubrum* tratado com terbinafina 50 x . Em A, B, C, D, E e F tem-se visão ampliada das proteínas. 61
- Figura 8.** Eletroforese bidimensional dos componentes protéicos totais de *T. rubrum* na faixa de pH de 3 a 10 sem tratamento. Gel corado pelo azul de Coomassie. 65
- Figura 9.** Eletroforese bidimensional dos componentes protéicos totais de *T. rubrum* tratado com nonila 10 x acima da CIM. Gel corado pelo azul de Coomassie 66
- Figura 10.** Eletroforese bidimensional do extrato protéico total de *T. rubrum* isolado clínico na faixa de pH de 3 a 10, comparada com *T. rubrum* tratado com protocatecuato de nonila 10 x . Em A, B, C e D têm-se visão ampliada das proteínas 67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - Graus Celsius
ABC – Transportador que codifica para um gene de resistência em fungos.
ASD - Ágar Sabouraud Dextrose
ATCC - American Type Culture Collection
CFM - Concentração fungicida mínima
CI₅₀ - Concentração Inibitória para 50% de células
CIF - Concentração inibitória fracionada
CIM - Concentração inibitória mínima
CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute
DCC - *N, N'*- dicyclohexylcarbodiimide
DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO - Dimetilsulfoxido
DTT - ditionitrosol
ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Fase log - Fase logarítmica
FLU - fluconazol
ICIF - Índice de concentração inibitória fracionada
IS – Índice de Seletividade
KDa – Kilodalton
log *P* - logaritmo do coeficiente de partição em um sistema bifásico
M - molar
MCZ - miconazol
MeOH – metanol
mg - miligrama
mL - mililitro
MM - massa molecular
mM - milimolar
MOPS - Ácido 3- (*N*-morfino) propanosulfônico
MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- brometo de difeniltetrazólio
NCBI – Centro Nacional de Informações Biotecnológicas
NIS - nistatina
nm - nanômetro
OMS - Organização Mundial da Saúde
p/v - peso/volume
PAF - Proteína antifúngica de *Penicillium chrysogenum*
PBS - Solução Salina Tamponada com Fosfato
pH - potencial hidrogeniônico
PI - Ponto isoelétrico
rpm - rotações por minuto
SDS – PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SFB - Soro Fetal Bovino
TCA - ácido tricloroacético
TEMED - Tetra metil etileno diamino
Tm1 - *Trichophyton interdigitale* isolado clínico 1
Tm2 - *Trichophyton interdigitale* isolado clínico 2
Tm3 - *Trichophyton interdigitale* ATCC 40131

Tr1 - *Trichophyton rubrum* isolado clínico 1

Tr2 - *Trichophyton rubrum* isolado clínico 2

Tr3 - *Trichophyton rubrum* MYA 3108

Tris - 2-amino-2-hidroximetilpropano

TruMDR1- Gene de resistência que codifica um transportador ABC, em *T. rubrum*.

TruMDR2- Gene de resistência que codifica um transportador ABC, em *T. rubrum*.

UFC - Unidades formadoras de colônia

V – Volts

YEPD - Yeast Extract Peptone Dextrose

µg - micrograma

µL - microlitro

µM - micromolar

Resumo

São evidentes a necessidade de novas substâncias antifúngicas e a grande importância dos produtos naturais no desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas. Assim, neste estudo avaliou-se a atividade antifúngica dos derivados sintéticos esterificados do ácido protocatecuico. Todos os isolados apresentaram bons resultados ao teste de suscetibilidade aos derivados sintéticos do ácido protocatecuico demonstrando que 62,5% foram ativos em relação para dois isolados de *T. rubrum* (Tr1 e Tr2), *T. rubrum* MYA 3108 (Tr3) e isolado clínico *T. interdigitale* (Tm1) e 68,7%, para isolado clínico *T. interdigitale* (Tm2) e *T. interdigitale* ATCC 40131 (Tm3) dos 16 compostos testados. Como referência para avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram considerados todos os resultados com valores $\leq 62,5 \mu\text{g/mL}$. A combinação fluconazol mais protocatecuatos de pentila, hexila, heptila, octila e nonila foi aditivo para isolados clínicos Tr1, Tm1 e Tm3, exceto a combinação com fluconazol mais protocatecuato de heptila, que revelou um efeito sinérgico contra Tm3. A griseofulvina em combinação com protocatecuato de nonila mostrou atividade sinérgica em duas linhagens de dermatófitos, atividade aditiva para quatro linhagens. Oito derivados do ácido protocatecuico foram associados quimicamente com o miconazol sendo encontradas interações sinérgicas e aditivas. Foi testada a associação entre protocatecuatos e o antifúngico nistatina, resultando interações antagônicas, demonstrando assim que o polieno não possui ação antifúngica quando combinada aos ésteres. Resultados dos testes de citotoxicidade pelo MTT realizados em células de macrófagos alveolares de camundongos (AMJ2-C11) indicaram que se trata de compostos de baixa toxicidade. Foi analisado o proteoma total do isolado clínico de *T. rubrum* antes e após o contato com terbinafina e os resultados revelaram modificações na expressão de 26 proteínas. A eletroforese bidimensional também foi realizada com os componentes protéicos de *T. rubrum* tratados com o protocatecuato de nonila, revelando alterações na expressão de oito proteínas. De acordo com informações técnicas levantadas, os ésteres do ácido protocatecuico, bem como suas associações com fármacos podem constituir uma fonte promissora de protótipos para a busca de novos agentes terapêuticos.

Palavras-chave: antifúngicos, ácido protocatecuico, protocatecuatos, *Trichophyton*, sinergismo, proteômica, eletroforese bidimensional.

Abstract

There is a clear need for new antifungal compounds, and the importance of natural products in the development of novel therapeutic tools. In this study, it was evaluated the antifungal activity of protocatechuic acid esters. All of the fungus isolated showed good results when testing susceptibility to synthetic derivatives of protocatechuic acid, showing that 62.5% were active against two strains of *T. rubrum* (Tr1 e Tr2), *T. rubrum* MYA 3108 (Tr3) and clinical isolate *T.interdigitale* (Tm1) and 68.7% for clinical isolate of *T. interdigitale* (Tm2) and *T. interdigitale* ATCC 40131 (Tm3) of the 16 compounds tested. Reference values of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) were considered ≤ 62.5 ug/ mL. The combination of fluconazole plus pentyl, hexyl, heptyl, octyl and nonyl protocatechuates was additive to clinical isolates Tr1, Tm1 and Tm3, except the combination fluconazole plus heptyl protocatechuate, which showed a synergistic effect on Tm3. Griseofulvin in combination with nonyl protocatechuate exhibited synergistic activity two towards dermatophyte strains, additive interaction for four strains. When eight protocatechuic acid derivatives were chemically associated with miconazole, were observed synergistic and additive effects. We tested the association between protocatechuates and nystatin, resulting in antagonistic interactions. Thus it demonstrated that have not a polyene antifungal best when combined with protocatechuic acid esters. Results of cytotoxicity tests by MTT assay using alveolar macrophages (AMJ2-C11) cells indicated that esters showed low toxicity. It was analyzed the proteome of the total clinical isolate of *T. rubrum* before and after contact with the terbinafine and the results indicated changes in the expression of 26 proteins. The two-dimensional electrophoresis was also performed with the protein components of *T. rubrum* treated with nonyl protocatechuate, suggesting changes in the expression of 8 proteins. According to data found throughout laboratory tests, protocatechuic acid esters, as well as their associations with drugs constitute a promising source of prototypes for the search for novel therapeutic agents.

Keywords: antifungal, protocatechuic acid, protocatechuate, *Trichophyton*, synergism, proteomics, two- dimensional electrophoresis.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Produtos naturais e síntese de novas compostos

Produtos naturais têm sido a fonte mais produtiva de novos fármacos. Várias razões foram apresentadas para explicar essa pesquisa; entre elas está sua diversidade química (Harvey, 2007). Em relação à busca de novos fármacos, um antifúngico ideal deveria ter atividade fungicida de amplo espectro e não causar toxicidade ao hospedeiro (Carrillo-Muñoz et al., 2006).

As plantas têm sido usadas na medicina por longa data, sendo extensivamente empregadas na medicina popular por representarem uma alternativa econômica de fácil obtenção e aplicabilidade para diversas patologias (Rojas et al., 2006). São uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se apresentam como modelos para a síntese de um grande número de fármacos (Simões et al., 2001). Atenção especial tem sido direcionada para derivados naturais com base no conhecimento da produção de compostos antifúngicos pela natureza (Wojtaszek, 1997; Gurgel et al., 2005). Os extratos obtidos de plantas tais como *Euphorbia prostata*, *Salvia texana*, *Colubrina greggii*, *Clematis drummondii*, dentre outras, têm demonstrado resultados promissores que estimulam a busca de novas fontes vegetais com potencial antifúngico (Alanís-Garza et al., 2007; Matasyoh; Mayo; Ngure, 2008).

É evidente a grande importância dos produtos naturais no desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas. Nesse quesito, as plantas medicinais e seus metabólitos derivados são importantes para pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de fármacos. Isto tanto porque podem ser utilizadas diretamente como agentes terapêuticos, como também de fonte de matéria-prima para síntese ou ainda podem servir de protótipos para novos modelos farmacologicamente ativos (Brasil, Ministério da Saúde, 2006).

Englobando todas as novas entidades químicas aprovadas como fármacos chega-se a um total aproximado de 1.184 das substâncias pesquisadas entre 1981-2006; 5% correspondem a produtos naturais, 47% correspondem a derivados semi-sintéticos de produtos naturais, mímicos de produtos naturais e sintetizados com grupos farmacofóricos baseados em produtos naturais, 18% são biológicos e vacinas e 30% são totalmente sintéticos

(Newman; Cragg, 2007). A originalidade de muitas estruturas de produtos naturais atrai a atenção para seu uso como ponto de partida para semi-síntese e síntese total (Butler, 2005).

Modificações de produtos naturais por meio da semi-síntese levaram a produtos obtidos por combinações de diversos tipos de modificações. O antibacteriano meticilina é obtido através de modificações semi-sintéticas da penicilina G, gerando uma estrutura com maior estabilidade química. A telitromicina é um antibacteriano com modificações semi-sintéticas da eritromicina (Nussbaum et al., 2006). Derivados semi-sintéticos da vancomicina e teicoplanina contendo substituintes hidrofóbicos na subunidade do carboidrato mostraram-se ativos contra linhagens bacterianas resistentes à vancomicina. O desenvolvimento de quimioterápicos de origem sintética e o descobrimento de novos antibióticos potentes isolados de fontes naturais representam contribuições inestimáveis na luta contra resistência bacteriana (Nussbaum et al., 2006).

A maioria dos fármacos antifúngicos tem origem nos produtos naturais. As equinocandinas atuam inibindo a biossíntese de componentes da parede celular dos fungos. Os antifúngicos caspofungina, micafungina e anidalfungina têm sido bastante úteis no tratamento de infecções fúngicas apresentando menores efeitos adversos que a anfotericina. Caspofungina e micafungina são derivados semi-sintéticos disponíveis no mercado internacional (Harvey, 2008), porém, ainda não totalmente disponíveis no mercado brasileiro.

1.2. Atividades de Ésteres do Ácido Protocatecuico

O ácido protocatecuico (ácido 3,4- dihidroxibenzóico, figura 1), é um derivado do ácido benzóico encontrado em frutas, nozes e vegetais, tais como azeitonas e arroz (Soares, 2002).

A presença dos compostos fenólicos tem sido muito estudada por estes apresentarem atividades farmacológicas e também por inibirem a oxidação lipídica e a proliferação de fungos. Os ácidos fenólicos são algumas das substâncias que constituem o grupo dos compostos fenólicos. Caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na estrutura (Soares, 2002). Estudos de laboratório com animais demonstraram que o ácido protocatecuico é um eficaz anticarginogênico com propriedades antioxidantes, protege contra o estresse oxidativo, exerce

efeitos preventivos nas doenças cardiovasculares que estão associados aos radicais livres (Reis, 2010).

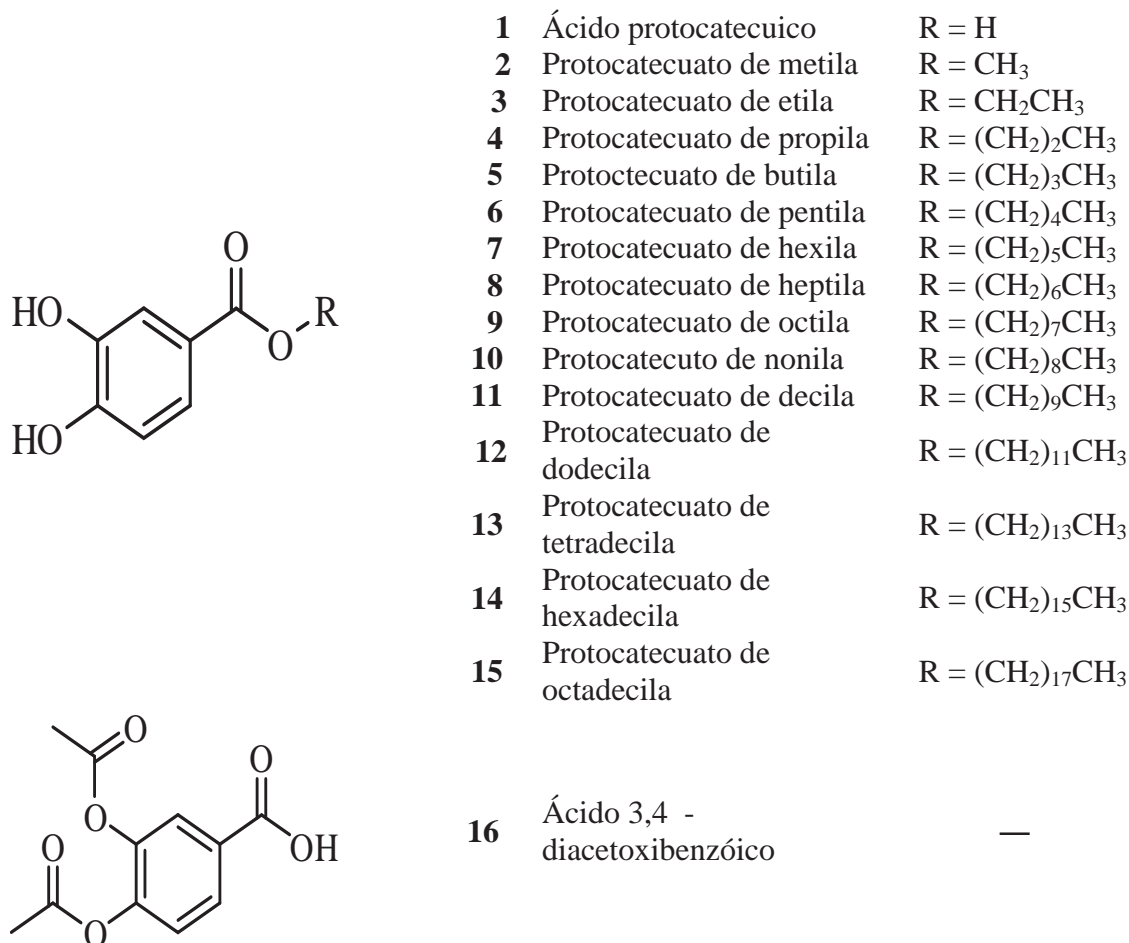


Figura 1. Estruturas químicas do ácido protocatecuico (1) e seus ésteres (2-16).

1.3. Dermatofitoses

Milhões de seres humanos e animais sofrem de infecções superficiais causadas por um grupo de fungos filamentosos altamente especializados, os dermatófitos, que infectam exclusivamente estruturas queratinizadas (Burmester et al., 2011). Os dermatófitos são um grupo de fungos que, em vida parasitária, vivem à custa de queratina da pele, unhas e pêlos. Enquadram-se os gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* que se caracterizam

de acordo com a formação e morfologia dos seus conídios (Cabañes, 2000; White et al., 2008; Peres et al., 2010).

Embora as infecções dos dermatófitos sejam restritas às superfícies da epiderme, estes podem ser invasivos e provocar infecções graves e disseminadas em pacientes imunodeprimidos, com desenvolvimento de granulomas (Peres et al., 2010). Nesses casos, a doença deixa de ser superficial e atinge camadas mais profundas da derme causando lesões granulomatosas. Em geral, os dermatófitos vivem confinados no estrato córneo da epiderme e apêndices cutâneos, principalmente nas áreas úmidas do corpo a exemplo das regiões entre os dedos do pé, virilhas e abaixo do seios (Chuang et al., 2007).

Esses fungos produzem queratinases que são enzimas proteolíticas capazes de hidrolisar queratina, principal proteína constituinte do cabelo, unhas e pele. A infecção pode ter sintomas leves a graves dependendo da resposta imunológica do hospedeiro (Akçaglar et al., 2011; Weeks J. et al., 2003). A queratina, o colágeno e a elastina constituem 25% da massa dos mamíferos. A enzima necessária para hidrolisá-los é a queratinase produzida pelos dermatófitos em tecidos infectados e, por isso, está inerente à virulência dos dermatófitos (Simpanya, 2000). As queratinases e outras enzimas são liberados no processo da patogênese e os queratinócitos são ativados, desencadeando uma resposta inflamatória mediada por citocinas e receptores, compreendendo a imunidade inata, bem como adquirida, incluindo neutrófilos, macrófagos, anticorpos e células T (Brasch, 2009).

A colonização por um dermatófito e a sua capacidade em causar uma infecção no hospedeiro dependem de vários fatores. Dentre os quais se destacam o fato de não serem responsivos aos mecanismos de proteção do hospedeiro que incluem a secura, o pH ligeiramente ácido e a contínua regeneração da pele, o efeito fungicida dos ácidos graxos, o estado da camada queratinizada e de outros fatores como a competição com a microbiota normal da epiderme (Erbagci, 2004).

A instalação da infecção inicia-se pela inoculação do artrósporo depositado sobre a pele, favorecido por lesão cutânea ou escoriação pré – existente (Sidrim & Rocha, 2004) e notável habilidade enzimática para degradar a queratina (Abdel-Rahman, 2000; Simpanya, 2000; Macedo et al., 2005). Além disso, também pode infectar várias espécies animais, determinando de modo geral, lesões secas, arredondadas e comumente não pruriginosas que se distribuem focalmente na superfície cutânea sem causar transtornos gerais aos animais afetados (Pereira & Meireles, 2001). Os animais servem como reservatórios de dermatófitos e suas infecções têm considerável importância zoonótica (Cabañes, 2000).

Os dermatófitos não fazem parte da flora normal dos humanos nem são microrganismos oportunistas, mas verdadeiros patógenos que infectam os tecidos queratinizados, unhas ou cabelo de indivíduos saudáveis (Baeza et al., 2007; Monod, 2008). Os dermatófitos em seu estado saprofítico digerem a queratina *in vitro*, utilizando assim como substrato. Possuem a capacidade de invadir tecidos vivos e provocar determinadas lesões, cuja severidade se relaciona, em parte, à reação do hospedeiro ao organismo invasor, e aos fatores tais como: virulência da espécie ou da estirpe infectante; reação do hospedeiro aos produtos metabólicos produzidos pelo fungo; local anatômico da infecção e fatores locais ambientais (Simpanya, 2000).

Espécies de dermatófitos são caracterizadas com base em seu nicho ecológico: geofílicos, zoofílicos e antropofílicos. As espécies geofílicas são encontradas no solo e raramente produzem infecções em seres humanos. As espécies zoofílicas colonizam animais e podem ser transmitidas ao ser humano, sendo responsáveis por cerca de 30% das dermatofitoses humanas e geralmente provocam inflamação aguda. Já as espécies antropofílicas representam cerca de 70% das infecções nesses hospedeiros causando infecções crônicas de progressão lenta, sugerindo que o fungo tenha se adaptado ao hospedeiro humano (White et al., 2008; Peres et al., 2010).

O aspecto clínico varia de acordo com o local da lesão e com o agente etiológico envolvido. Frequentemente produzem lesões circinadas descamativas, eritematosas, às vezes vesiculosas, pustulosas, podendo ou não apresentar hiperqueratose. Nas unhas, o acometimento pode ser subungueal invasivo ou localizado. No couro cabeludo são observadas as formas tonsurantes, com alopecia que regride após a cura e a fávica, crostosa e pustulosa, que acomete o folículo piloso causando alopecia definitiva (Weitzman & Summerbell, 1995).

1.3.1. Epidemiologia

A distribuição dos dermatófitos varia em diferentes países e depende de vários fatores como estilo de vida, tipo da população, condições sócio – econômicas, migração de pessoas, idade, presença de animais domésticos e condições climáticas (Dolenc-Voljc, 2005). Elas podem alcançar altos níveis endêmicos e necessitar de intervenções públicas específicas

(Seebacher; Bouchara; Mignon, 2008). A Academia Americana de Dermatologia estima que uma parcela de 10-20 % da população é afetada por dermatófitos (Pfaller; Sutton, 2006).

Epidemiologicamente, as espécies *T. rubrum* e *T. interdigitale* se destacam como os principais agentes etiológicos de dermatofitoses em humanos. No Brasil trabalhos de inúmeros pesquisadores, apontam registros do predomínio dessas espécies como um dos principais agentes causadores de dermatofitoses em humanos, nas mais diversas manifestações clínicas (Rezende et al., 2008).

Em um trabalho desenvolvido por Simonnet e colaboradores, na Guiana Francesa, com 726 pacientes, foi verificado que (28,2 %) apresentaram diagnóstico presuntivo de onicomicoses (infecções das unhas), (27,8 %) *Tinea capitis*, (22,0 %) micoses superficiais cutâneas dos pés, e de outras áreas do corpo (21,9 %). *Trichophyton rubrum* foi o dermatófito mais comum recuperado de casos de onicomicose (67,4 %), *Tinea pedis* (70,6 %) e *Tinea corporis* (52,4 %). A prevalência do *T. rubrum* e ocorrência de onicomicoses e micoses dos pés, na Guiana Francesa são similares aos resultados reportados da Europa, enquanto que a frequência de *tinea* do couro cabeludo e da importância de *T. tonsurans* em tais infecções são semelhantes aos da situação nas Américas (Simonnet et al., 2011).

No Brasil, o Sul e Sudeste revelaram uma alta incidência de infecções causadas por dermatófito *T. rubrum*, seguido por *M. canis* e *T. interdigitale*, enquanto no Nordeste, *T. tonsurans*, *T. rubrum* e *M. canis* apresentam maior predominância (Purim; Freitas & Leite, 2009).

Em um estudo na região norte do Rio Grande do Sul, constituído por 100 indivíduos, verificou-se que entre os atletas, a frequência das onicomicoses e *tinea pedis* foi de 32% e, para o grupo de não atletas, foi de 20%. Os patógenos identificados foram dermatófitos (84,8 %), leveduras (15,2 %) e o organismo mais comumente identificado foi *T. rubrum*, seguido pelo *T. interdigitale* (Sabadin et al., 2011).

Existe uma predominância de *T. rubrum* como principal agente etiológico em várias regiões geográficas do mundo como Japão, Estados Unidos, México e em regiões do Brasil (Welsh et al., 2006). No entanto, alguns estudos mostram o aparecimento de outros dermatófitos como principais agentes causadores de infecção; entre eles o *T. interdigitale* e *M. canis* (Dolenc-Voljc, 2005).

O *T. rubrum* pode produzir praticamente todos os quadros clínicos de dermatofitose e tem como características principais a tendência para cronicidade e a resistência aos tratamentos convencionais (Siqueira et al., 2006). A frequência desse agente aumenta com o processo de urbanização levando à sua predominância como causador da dermatofitose em

grandes centros urbanos (Ruiz & Zaitz, 2001). O reconhecimento dos dermatófitos ao nível de espécie e as informações sobre a sua ecologia têm um papel importante nos estudos epidemiológicos e na saúde pública; especialmente para espécies que produzem surtos familiares ou institucionais (Sugita et al., 2006).

1.3.2. Tratamento

Para tratamento de infecções fúngicas de pele, os medicamentos tópicos são apropriados apenas para infecções iniciais ou leves, especialmente causadas por *T. rubrum*, principal causador da *tinea pedis*. Os principais fármacos administrados topicamente são ciclopirox e amorolfina. Ciclopirox atua na inibição da absorção de potássio, fosfato e aminoácidos enquanto a amorolfina atua na inibição do ergosterol da membrana celular do fungo (Shirwaikar et al., 2008).

Nas onicomicoses e infecções causadas por dermatófitos zoofílicos, que levam ao desenvolvimento principalmente de *tinea capitis* e *corporis*, a terapia usual é sistêmica (Tosti et al., 1998; White et al., 2008). Os principais fármacos utilizados no tratamento da onicomicose são terbinafina, itraconazol e griseofulvina (Garmendia et al., 2008).

A terbinafina é um antifúngico pertencente à classe das alilaminas, que age sobre a enzima esqualeno-epoxidase bloqueando a biossíntese do ergosterol da membrana celular dos fungos. É o fármaco mais utilizado para o tratamento das onicomicoses, pois apresenta alta eficácia e atividade fungicida. A terapia combinada (oral e tópica) melhora os resultados do tratamento (Garmendia et al., 2008)

A griseofulvina inibe o crescimento dos dermatófitos de todos os gêneros. É utilizada exclusivamente para controlar o desenvolvimento da infecção dos tecidos queratinizados apresentando, apenas, ação fungistática nas doses usuais. O mecanismo de ação deste fármaco está associado à interferência na polimerização dos microtúbulos causando anomalias na divisão celular por interferir na formação do fuso acromático. Atua também no crescimento anormal, provavelmente pela alteração do transporte intracelular associado aos microtúbulos (Odds, 2003).

Na terapia antifúngica há dois grupos de azóis que são utilizados na clínica: os imidazóis (cetoconazol, miconazol, clotrimazol e econazol) e os triazóis (fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol). O uso dos imidazóis é restrito ao tratamento de

micoses superficiais. Na medicina dermatológica, para o tratamento de infecções crônicas ou severas, os fármacos como terbinafina, itraconazol e fluconazol são mais utilizados (Fernández-Torres et al., 2001, Fernández-Torres et al., 2003a).

1.3.3. Resistência

Os relatos de recidivas estão geralmente associados à interrupção da terapia antifúngica e à resistência clínica à droga terbinafina que já vem sendo descrita na literatura. Mukherjee e colaboradores descreveram um caso de resistência clínica a terbinafina (Mukherjee et al., 2003). O isolado foi retirado de um paciente com onicomicose cujo tratamento oral com terbinafina não foi eficaz. O quadro exibiu, ainda, resistência cruzada a vários outros fármacos, incluindo naftina, butenafina, tonoftato e tolciolato, sugerindo mecanismo de resistência alvo-específica. O relato quanto à resistência à terbinafina já foi discutido e este se refere à mutação no gene esqualeno epoxidase levando à substituição do aminoácido L393F (Osborne et al., 2005). A resistência à terbinafina em espécies mutantes de *Aspergillus* spp, também foi referida, e neste indicou que houve mutação no gene que codifica a enzima esqualeno epoxidase (ErgA), resultando em alta resistência a esse antifúngico (Rocha et al., 2006; Espinel-Ingroff., 2008). Em estudos referentes aos mecanismos de resistência á terbinafina com o fungo *T. rubrum*, dois transportadores do tipo ABC, TruMDR1 e TruMDR2, mostraram-se importantes no processo de resistência, na secreção de enzimas e na patogenicidade desse dermatófito (Fachin et al ., 2006; Martinez-Rossi, 2008; Maranhão et al., 2009).

A resistência clínica à griseofulvina ou recidivas pós-terapias são comuns nas dermatofitoses. A resistência *in vitro* dos dermatófitos à griseofulvina é pouco relatada. Para *T. rubrum*, em estudo realizado por Zomorodian e colaboradores, foi verificado uma diminuição da expressão do gene que codifica a beta-tubulina, sob condições de pressão desta droga e a diminuição foi dependente da concentração. Esta informação contribuiu para um melhor conhecimento do mecanismo de ação e, conseqüentemente, pode auxiliar na utilização mais racional deste fármaco (Zomorodian et al., 2007).

1.4. Ensaio de sensibilidade

O teste de sensibilidade às drogas antifúngicas tem importante valor, principalmente do ponto de vista clínico, pois se pode prever êxito na terapêutica utilizada (Galgiani et al., 1992).

Os testes antifúngicos devem identificar resistência *in vitro* entre uma população de fungos suscetíveis ou deve detectar o desenvolvimento de resistência durante a terapia (Favel et al., 1995).

Os protocolos desenvolvidos pela Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; antigamente o National Committee for Clinical Laboratory Standards [NCCLS]) preconizam métodos de ensaio reprodutíveis da atividade de antifúngicos contra leveduras (M27-A3, M27-S3, M44-P e M44-A-S2 documentos) e fungos filamentosos (M38-A2) (Canton et al., 2009).

As metodologias para tais avaliações são variáveis, sendo realizadas a difusão em ágar e a diluição em ágar e caldo (Stoppa et al., 2009). Esses métodos têm por princípio vários parâmetros como tamanho do inóculo, concentrações definidas de agentes antifúngicos e diferentes condições que permitam o crescimento do microrganismo sem que haja interferência da atuação da droga (Colombo et al., 1995).

Muitos estudos no Brasil e no mundo têm sido publicados com objetivo de validar as metodologias atualmente empregadas para determinação de sensibilidade às drogas antifúngicas. Os trabalhos têm auxiliado o sucesso da terapêutica medicamentosa, pois estabelece uma relação entre a concentração inibitória mínima e à susceptibilidade do fungo à droga (Pappalardo & Melhem, 2003).

1.5. Sinergismo

Um arsenal de medicamentos fitoterápicos resulta de combinações de extratos, que podem assumir diferentes efeitos, incluindo aditivos, sinérgicos e antagônicos (Adams et al., 2006). Como alternativa ao tratamento de doenças fúngicas, a exemplo do que ocorre nas micoses invasivas, uma opção que vem sendo reportada é a terapia combinada. Informações sobre a eficácia das combinações são esparsas e consistem basicamente de resultados de estudos *in vitro* e em modelos animais experimentais. Entretanto essa terapia pode ser uma alternativa à monoterapia para pacientes com infecções invasivas que são difíceis de tratar. Podem ser exemplos as originadas por espécies multi – resistentes e aquelas que não respondem ao tratamento convencional (Cuenca-Estrella, 2004).

A combinação sinérgica de fármacos antifúngicos com substâncias de origem vegetal para aperfeiçoar seu desempenho biológico tem sido estudada com o intuito de viabilizar o uso de fármacos que apresentam considerável toxicidade (Han, 2007). Duas drogas que produzem efeitos semelhantes podem produzir efeitos exagerados ou diminuídos quando usados simultaneamente. A avaliação quantitativa é necessária para equacionar casos de simples ação aditiva. Esta distinção é baseada na definição clássica de aditividade farmacológica significando que cada componente contribui para o efeito de acordo com sua própria potência. Assim, as relações de potência dos agentes, não necessariamente constantes em todos os efeitos níveis, permitem um cálculo utilizando pares para determinar a dose equivalente a um ou outro agente e os efeitos usando o equivalente na relação dose-resposta do composto de referência (Tallarida, 2001). Desta forma, a atividade de extratos antifúngicos vegetais pode ser melhorada por meio da combinação entre diferentes substâncias de diversas plantas. Através dos estudos de sinergismo é possível validar e confirmar presença de interações demonstradas entre extratos de diferentes plantas e também entre componentes de um mesmo extrato (Biavatti, 2009).

Em uma investigação realizada por Yamada e colaboradores verificou-se que a monoterapia com voriconazol ou anfotericina B lipossomal, ambos indicados para o tratamento de aspergilose invasiva, apresentava baixa resposta durante o tratamento da doença (Yamada et al., 2010). Quando estas foram associadas à micafungina, ambas tiveram um efeito potencializado contra a infecção. A associação de drogas também foi estudada em isolados de casos de infecções disseminadas causadas por *T. asahii*, sendo avaliada a atividade

antifúngica de voriconazol, caspofungina e anfotericina B isoladamente e em combinação. Melhores resultados foram obtidos com a associação de caspofungina e anfotericina B, sugerindo que o tratamento com fármacos combinadas pode ser uma alternativa terapêuticamente útil (Li et al., 2010).

1.6. Proteômica

Os mecanismos de ação de muitos compostos com atividade antifúngica de fontes vegetais ainda não foram elucidados. Uma estratégia seria a utilização de sistemas proteômicos para prospecção de novos alvos moleculares (Sleno & Emili, 2008).

O termo proteoma foi introduzido no início dos anos 90 por Wilkins para indicar a proteína total e complementar expressa pelo genoma de uma célula, tecido ou organismo (Wilkins & Pasquali et al., 1996; Wilkins & Sanchez et al., 1996). O proteoma celular é muito complexo, formado por um grande número de proteínas que variam conforme o contexto, momento ou evento metabólico ao qual está submetido o organismo (Wilkins, et al, 1995). As análises proteômicas tornaram-se muito importantes no campo funcional do genoma, principalmente devido ao conhecimento adquirido dos vários genomas sequenciados. Entretanto estas informações não foram suficientes para explicar os eventos biológicos e encontrar alvos para novos fármacos (Anderson & Seilhamer, 1997). As análises proteômicas requerem uma grande variedade de técnicas analíticas incluindo separações eletroforéticas e espectrofotometria de massas para identificação. Sua aplicação pode ser na identificação de biomarcadores na pesquisa clínica, análise da interação entre as proteínas, modificações pós-traducionais, além da identificação de alvos terapêuticos potenciais (Westermeyer et al, 2005). A Bioinformática e a Bioestatística são essenciais para tais avaliações, bem como para o delineamento dos dados gerados (Smith et al., 2009).

A proteômica tornou-se uma tecnologia relevante para o estudo de microrganismos, tecidos, organelas celulares ou células. Várias abordagens têm sido usadas para estudar, por exemplo, o desenvolvimento do tumor, descoberta de biomarcadores (Acero et al., 2011) para orientar a terapia alvo molecular e monitorar a atividade e resposta terapêutica a um grande número doenças (Rifai et al., 2006).

A proteômica possui diversas aplicações e finalidades na área microbiológica. Um exemplo é a análise de componentes de superfície do *Aspergillus fumigatus* na identificação

de candidatos protéicos para a produção de vacinas e novas macromoléculas alergênicas (Asif et al., 2006). Outros proteomas além de fungos têm sido estudados. Os pesquisadores Caldelari e seus colaboradores analisaram o proteoma de *Streptococcus gordonii*, por eletroforese bidimensional e verificaram que o microrganismo resistente apresentou duas proteínas com intensidade aumentada, as quais mostraram relação com resistência à penicilina (Caldelari et al., 2000).

Assim, no presente trabalho se buscou novas substâncias com atividade contra as espécies de fungos dermatofíticos mais prevalentes a partir de ésteres do ácido protocatecuico. Além disso, também se pretendeu verificar o efeito de combinações destes com fármacos antifúngicos utilizado no tratamento destas infecções. Também foi utilizada a abordagem proteômica a fim de realizar a detecção de novos alvos terapêuticos potenciais e elucidar os mecanismos de ação de moléculas por meio da verificação das proteínas diferencialmente expressas após contato com esses compostos.

2. JUSTIFICATIVA

É sabido ser o Brasil um país rico em biodiversidade com enorme potencial de desenvolvimento biotecnológico nas mais diferenciadas linhas de produtos, principalmente os farmacológicos. Produtos naturais bioativos são o ponto de partida para o desenvolvimento de novos fármacos, síntese dessas substâncias e de derivados planejados, permitindo que se identifique o farmacóforo e possibilitando o planejamento de fármacos sintéticos. De acordo com a revisão bibliográfica elaborada para essa pesquisa, os estudos com extratos e substâncias derivadas de produtos naturais descrevem apenas sua potência, não aprofundando os estudos no sentido de reconhecer e validar alvos para elucidação do mecanismo funcional dos princípios ativos. Assim, no presente projeto foi realizada a bioprospecção de ésteres do ácido protocatecuico. Foi avaliado também o sinergismo entre esses derivados sintéticos na busca de novos fármacos combinados com atividade que mimetizem concentração anteriormente tóxica. Verificou o perfil de proteínas do isolado clínico de *T. rubrum* antes e após o contato com terbinafina e protocatecuato de nonila a fim de elucidar as prováveis proteínas- alvo. A importância dessa análise pode gerar a identificação de novos alvos interessantes neste grupo de fungos e na pesquisa de novos protótipos fungitóxicos.

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivos gerais*

Avaliar atividade anti-dermatofítica e sinérgica do ácido protocatecuico e seus ésteres, caracterizar as propriedades biológicas destes e verificar perfil protéico das células fúngicas antes e após o contato com substâncias que apresentaram maior potência.

3.2. *Objetivos Específicos*

- Realizar a bioprospecção de derivados sintéticos do ácido protocatecuico, avaliando atividade antifúngica;
- Avaliar a interação entre protocatecuatos e fármacos antifúngicos;
- Realizar testes de citotoxicidade dos protocatecuatos selecionados;
- Realizar a avaliação do perfil protéico total e diferencial para futura caracterização e identificação das proteínas que tiverem sua expressão modificada quando em contato com composto sintético do ácido protocatecuico e droga de referência utilizada no tratamento das dermatofitoses;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção dos compostos (1-16)

Os compostos foram cedidos por meio do projeto Biota-FAPESP e Bioprospecta-Fapesp, em associação com grupo de pesquisa da Dra. Dulce H. S. Silva e Dr. Luis O. Regasini, do Instituto de Química da UNESP-Araraquara.

4.1.1. Síntese dos protocatecuatos (2-15)

Uma alíquota de 3,0 mL de uma solução de *N, N* – dicitloexilcarbodiimida (DCC, 1,0 mmol) em dioxano anidro foi adicionada, na temperatura de 5°C, a uma solução de 0,2 mmol de ácido protocatecuico (**1**) e 20 mmol dos respectivos alcoóis *n*- alquílicos em 6,0 mL de dioxano anidro. O meio reacional foi mantido sob agitação durante 48 horas, sendo o solvente evaporado sob pressão reduzida. O resíduo foi lavado com acetato de etila (3x) e filtrado. O filtrado foi submetido à extração líquido – líquido com uma solução saturada de ácido cítrico (3 x) e, posteriormente, com solução saturada de bicarbonato de sódio (3x). A fase orgânica foi seca em sulfato de magnésio anidro e evaporada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica eluída com diferentes misturas de hexano e acetato de etila, fornecendo os ésteres alquílicos planejados (**2-15**) (Ximenes et al., 2010).

4.1.2. Síntese do ácido 3,4 – diacetoxibenzóico (16)

Para a síntese do derivado acilado (**16**), o ácido protocatecuico (**1**) foi dissolvido em 10,0 mL de piridina anidra e anidrido acético (1:1) sob atmosfera inerte de gás hidrogênio. O meio reacional foi mantido sob agitação por 48 horas à temperatura ambiente, sendo seco sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna eluída com

clorofórmio: metanol (85:15), redendo o ácido protocatecuico acilado (**16**) (Morais et al., 2010).

4.1.3. Diluição dos compostos

Para diluição dos compostos sintéticos foram utilizados microtubos tipo Eppendorf e como diluente utilizou-se DMSO, solubilizados com o auxílio do vórtex. Foram realizados cálculos para determinação da quantidade de cada substância testada para que a concentração inicial na placa de microdiluição fosse 250 µg/mL.

Para os experimentos realizados neste trabalho foram preparadas soluções de antifúngicos, que foram diluídos conforme preconizado o documento M38-A proposto pelo CLSI (2002) com algumas modificações.

O fluconazol foi diluído em água estéril para preparo da solução-estoque, a griseofulvina e terbinafina foram dissolvidos em DMSO. Após as diluições conforme recomendações do protocolo M38-A foram obtidas para fluconazol soluções com concentrações finais de 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25 e 0,125 µg/mL em RPMI. Para a griseofulvina e terbinafina, foi obtido concentrações finais de 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625, 0,0313 e 0,0156 ug/mL em RPMI.

4.2. Cultivo dos dermatófitos

Neste estudo foram selecionados dois isolados clínicos de *T. rubrum*, denominados Tr1 e Tr2, uma cepa ATCC *T. rubrum* ATCC MYA 3108 (Tr3), dois isolados clínicos de *T. interdigitale* (Tm1 e Tm2), *T. interdigitale* ATCC 40131 (Tm3). A manutenção de todas as cepas foi realizada por repiques periódicos. Os dermatófitos foram cultivados em Ágar Sabouraud Dextrose (Difco TM) por 7 dias, a temperatura ambiente. As características dos dermatófitos estão descritas a seguir.

Tr1 e Tr2: Cepas pertencentes à micoteca do Laboratório de Micologia do Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP), previamente isoladas a partir dos exames de rotina encaminhados ao mesmo laboratório.

Tr3: Linhagem isolada de paciente com dermatofitose, (ATCC MYA-3108) cedida gentilmente pela Profa. Dra. Ana Lucia Fachin da Unidade de Biotecnologia (UNAERP), antes da ruptura do gene *TruMDR2*.

Tm1 e Tm2: Cepas pertencentes à micoteca do Laboratório de Micologia do Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP), previamente isoladas a partir dos exames de rotina, foram encaminhadas ao mesmo laboratório.

Tm3: Cepa de *T. interdigitale* ATCC 40131, pertencente à micoteca do Laboratório de Micologia do Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP).

4.3. Preparo do inóculo

Após o crescimento de 7-10 dias em temperatura ambiente, em tubos contendo Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), as colônias fúngicas foram cobertas com 5 mL de salina estéril (NaCl 0,85%). Os esporos foram suavemente suspensos com o auxílio de uma alça em anel descartável e depois transferidos para um tubo estéril onde permaneceram por 30 minutos, com o objetivo de se obter a separação dos microconídeos. A partir desta suspensão, foi realizada a contagem dos esporos em Câmara de Neubauer, com o objetivo de se obter um inóculo final com 5×10^3 UFC/mL.

4.4. Avaliação da suscetibilidade de dermatófitos aos antifúngicos pela técnica de microdiluição

Para posterior determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi utilizada adaptação da metodologia segundo o CSLI M38-A (2002), com modificações. Para tanto, nesta técnica foram utilizadas microplacas de 96 poços. O meio de cultura utilizado foi o RPMI com 2% de glicose tamponado com MOPS pH 7,2. A coluna 1 foi utilizada para controle negativo do teste, contendo assim apenas meio de cultura (200 µL). A partir da coluna 2 até 11, nas fileiras A a H, foram colocadas diluições decrescentes dos compostos em estudo. Na coluna 2, colocou-se o RPMI suplementado com 2% de glicose em quantidade calculada previamente de acordo com a concentração do composto diluído em DMSO.

Colocou-se então a substância na coluna 2, sendo que o volume final nesse poço foi de 200 μL . Posteriormente na coluna 2 foram retirados 100 μL e repassados à coluna 3 e assim sucessivamente até a coluna 11 para a qual foram retirados 100 μL e descartados, obtendo-se então a diluição do composto sintético. Por fim, foram colocados 100 μL da suspensão de células na concentração de $5,0 \times 10^3$ UFC/mL em cada poço, nas colunas 2-12.

Foi feito também o controle com os fármacos, colocando 100 μL da suspensão de células em cada poço na coluna 2 a 11. Posteriormente, foram adicionados 100 μL do antifúngico em suas respectivas diluições conforme determinado na portaria M 38- A do CSLI. As placas foram incubadas a 35°C e a leitura foi feita depois de 168 horas. Foi realizada leitura visual e espectrofotométrica a 490 nm. Utilizou-se o indicador de viabilidade celular (AlamarBlue[®]) para confirmação da CIM. Para os derivados azólicos a CIM foi definida como a concentração que apresentou uma inibição de 50% e para a terbinafina e griseofulvina, uma inibição de 80% do crescimento fúngico, comparadas ao controle do inóculo. CIM₅₀ e CIM₈₀ foram definidas como as CIMs capazes de inibir 50% e 80% dos isolados, respectivamente.

4.5. Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A determinação da Concentração Fungicida Mínima foi realizada em placa de Petri contendo ágar Sabouraud. A placa de Petri foi previamente demarcada de acordo com as posições das diluições dos compostos e controles positivos na placa de microdiluição. Uma alíquota do conteúdo dos poços da placa de microdiluição foi transferida com auxílio de um palito estéril para o respectivo local na placa de Petri. Após 96 horas de incubação a 35°C , foi verificado o crescimento de colônias e as respectivas concentrações. Foi determinada como CFM, ou seja, a menor concentração do composto em estudo ou fármaco antifúngico em situação tal que não tenha ocorrido o desenvolvimento dos microrganismos.

4.6. Avaliações das Associações

As associações entre os protocatecuatos e fármacos antifúngicos foram estudados empregando os métodos do tabuleiro de xadrez e associação equimolar. O método do tabuleiro do xadrez foi empregado para o estudo com os fármacos fluconazol e griseofulvina, enquanto a associação química foi utilizada para os estudos com miconazol e nistatina.

4.6.1. Método do tabuleiro de xadrez

O método do “tabuleiro de xadrez” foi baseado no procedimento estabelecido pelo CLSI. A técnica de microdiluição em caldo para o teste de sensibilidade antifúngica foi executada (CLSI, 2002). O meio de cultura utilizado foi o RPMI-1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio e acrescido de 2% de glicose, tamponado com MOPS 0,165M, pH 7,2. Em cada orifício da microplaca, foram adicionados 50 μ L de cada composto em dosagem 4 vezes a concentração final, nas fileiras de A a G e colunas de 2 a 11. A análise combinatória foi realizada envolvendo as associações entre protocatecuatos e fármacos antifúngicos. Por exemplo, as concentrações finais do agente antifúngico griseofulvina variaram de 0,0625 μ g/mL à 0,0007 μ g/mL e para o protocatecuato de nonila variaram de 15,6 μ g/mL à 0,03 μ g/mL. Em cada poço foram adicionados 100 μ L de suspensão fúngica ($5,0 \times 10^3$ UFC/mL); como controle negativo foram utilizados 200 μ L de RPMI (coluna 1 orifício A até D) e, para controle positivo, 100 μ L de RPMI com 100 μ L de inóculo (coluna 1 orifício E até H). Na coluna 12 foi colocado o fluconazol, utilizado como controle de droga e, na linha H orifício 2 até 11, foi colocado somente o protocatecuato de nonila, e adicionaram-se 100 μ L de inóculo em todos os orifícios; assim se obteve a CIM individual de cada substância. As concentrações finais em μ g/mL das duas substâncias associadas podem ser visualizadas na figura 2. As placas foram incubadas a 35°C e a leitura foi feita após 168 horas. Foram realizadas leituras visuais e espectrofotométricas a 490 nm.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C-	0,0625 <i>15,6</i>	0,0625 <i>7,8</i>	0,0625 <i>3,9</i>	0,0625 <i>1,95</i>	0,0625 <i>0,97</i>	0,0625 <i>0,48</i>	0,0625 <i>0,24</i>	0,0625 <i>0,12</i>	0,0625 <i>0,06</i>	0,0625 <i>0,03</i>	0,25
B	C-	0,031 <i>15,6</i>	0,031 <i>7,8</i>	0,031 <i>3,9</i>	0,031 <i>1,95</i>	0,031 <i>0,97</i>	0,031 <i>0,48</i>	0,031 <i>0,24</i>	0,031 <i>0,12</i>	0,031 <i>0,06</i>	0,031 <i>0,03</i>	125
C	C-	0,015 <i>15,6</i>	0,015 <i>7,8</i>	0,015 <i>3,9</i>	0,015 <i>1,95</i>	0,015 <i>0,97</i>	0,015 <i>0,48</i>	0,015 <i>0,24</i>	0,015 <i>0,12</i>	0,015 <i>0,06</i>	0,015 <i>0,03</i>	0,0625 CIM
D	C-	0,007 <i>15,6</i>	0,007 <i>7,8</i>	0,007 <i>3,9</i>	0,007 <i>1,95</i>	0,007 <i>0,97</i>	0,007 <i>0,48</i>	0,007 <i>0,24</i>	0,007 <i>0,12</i>	0,007 <i>0,06</i>	0,007 <i>0,03</i>	0,0312
E	C+	0,003 <i>15,6</i>	0,003 <i>7,8</i>	0,003 <i>3,9</i>	0,003 <i>1,95</i>	0,003 <i>0,97</i>	0,003 <i>0,48</i>	0,003 <i>0,24</i>	0,003 <i>0,12</i>	0,003 <i>0,06</i>	0,003 <i>0,03</i>	0,015
F	C+	0,0015 <i>15,6</i>	0,0015 <i>7,8</i>	0,0015 <i>3,9</i>	0,0015 <i>1,95</i>	0,0015 <i>0,97</i>	0,0015 <i>0,48</i>	0,0015 <i>0,24</i>	0,0015 <i>0,12</i>	0,0015 <i>0,06</i>	0,0015 <i>0,03</i>	0,007
G	C+	0,0007 <i>15,6</i>	0,0007 <i>7,8</i>	0,0007 <i>3,9</i>	0,0007 <i>1,95</i>	0,0007 <i>0,97</i>	0,0007 <i>0,48</i>	0,0007 <i>0,24</i>	0,0007 <i>0,12</i>	0,0007 <i>0,06</i>	0,0007 <i>0,03</i>	0,003
H	C+	62,5	31,2	15,6	7,8 <i>CIM</i>	3,9	1,95	0,97	0,48	0,24	0,12	0,001

CIM da nonila

CIM da combinação

CIM da griseofulvina

Figura 2. Exemplo de esquema de combinação de compostos na placa de microdiluição de 96 poços. Teste combinatório com griseofulvina (em negrito) e protocatecuato de nonila (em itálico). C-: Controle Negativo; C+: Controle Positivo. * **CIM** e *CIM* Concentração Inibitória Mínima de griseofulvina e do protocatecuato de nonila, respectivamente.

Para verificar o efeito combinatório da griseofulvina e protocatecuato de nonila, adotou-se o índice de concentração inibitória fracionada (ICIF), o qual pode ser sinérgico, aditivo, indiferente ou antagônico (Johnson et al., 2004). Para o cálculo do IFIC seguiu-se a fórmula:

ICIF = a/b + a/c, onde; **a = CIM** (protocatecuato + fármaco antifúngico), **b = CIM** (protocatecuato) e **c = CIM** (fármaco antifúngico).

4.6.2. Associação equimolar

A associação equimolar foi realizada por meio da mistura simples dos pós, segundo as respectivas massas molares, miconazol (MM =416 g/mol) e nistatina (MM= 926 g/mol). Exemplo geral; para a associação equimolar de miconazol (MM = 416 g/mol) + protocatecuato de dodecila (MM=322 g/mol), foram misturados 4,2 mg de miconazol e 3,2 mg de protocatecuato de dodecila. Dessa forma, a mistura final apresentou em 7,4 mg (4,2 mg + 3,2 mg), quantidades similares do protocatecuato em estudo e o fármaco antifúngico, ambos em μmol .

A associação entre os protocatecuatos, miconazol e nistatina foi classificada segundo os valores de índice de concentração inibitória fracionada (IFIC) de modo semelhante àquele empregado para a análise de associação entre protocatecuatos, fluconazol e griseofulvina (método do tabuleiro de xadrez).

A classificação da associação equimolar foi definida como antagônica, indiferente, aditiva e sinérgica. Foi realizada segundo os valores de ICIF de modo idêntico àquele utilizado para os estudos utilizando o método do tabuleiro de xadrez.

Para avaliação das combinações pelo método de tabuleiro de xadrez e associação equimolar utilizou-se as seguintes classificações: sinérgica quando o ICIF é menor ou igual a 0,5; aditiva quando ICIF é maior que 0,50 e menor/igual a 1,0; indiferente quando ICIF é maior que 1 e menor/igual 4; e antagônica quando ICIF é maior 4,0 (Johnson et al., 2004).

4.7. Tratamento das células fúngicas e extração de proteínas

Os fungos filamentosos foram cultivados em meio YEPD na concentração de 5×10^3 UFC/mL e incubado em temperatura ambiente durante 7 dias até atingirem a fase *log* da curva de crescimento. Então foi adicionada terbinafina em uma concentração 50 vezes superior a CIM previamente determinada ficando em contato por mais 7 dias. O mesmo procedimento foi realizado para o protocatecauto nonila na concentração 10 vezes acima da CIM. O cultivo foi lavado com água destilada para a retirada do meio de cultura e do extrato. Ao “pellet” foram acrescidos 5 mL da solução 10 mM Tris-HCl e triturado em nitrogênio líquido. O “pellet” foi colocado em contato com solução desnaturante composta por uréia 4 M, SDS 2%,

β -mercaptoetanol 2% segundo Pendrak, et al., (2000). Como controle foram usados os fungos filamentosos cultivados em meio YEPD e não entraram em contato com os demais compostos.

4.7.1. Doseamento protéico

A dosagem das proteínas após a extração foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Alíquotas de 100 μ L de amostra foram adicionadas em 5 mL do reagente diluído (1:4) em tubos e incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente. Na sequência foi feita a leitura em espectrofotômetro a 595 nm. As concentrações das proteínas foram calculadas por meio da comparação com uma curva-padrão e realizados os cálculos para obtenção de 600 μ g de proteína por mL.

4.7.2. Análise do perfil protéico por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Os perfis protéicos foram analisados quanto à sua alteração após a exposição à terbinafina e ao protocatecuato de nonila por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio, SDS-PAGE, sob condições redutoras, utilizando sistema de tampão descontínuo de Laemmli, (1970) e Studier, (1973).

4.7.3. Eletroforese Bidimensional

4.7.3.1. Focalização Isoelétrica (Primeira dimensão)

As proteínas foram separadas de acordo com o seu ponto isoelétrico (pI), sendo submetidas à focalização isoelétrica, utilizando-se o sistema Ettan IPGphor 3 (GE

Healthcare). As fitas utilizadas para a caracterização das proteínas presentes na amostra foram de 13 cm de comprimento, não lineares, com gradiente de pH variando de 3-10.

4.7.3.2. Preparo da amostra

De acordo com os cálculos realizados durante a dosagem pelo método de Bradford, pipetou-se o volume adequado de amostra e adicionou-se TCA 10% em acetona, para realização da precipitação, a qual foi feita a 4 °C durante 12 horas. Em seguida, foi centrifugada a amostra a 10.000 RPM por 15 minutos, três vezes com acetona 90%. Depois de lavar três vezes descartou-se a acetona e adicionou-se De-Streak, IPG Buffer e solução de reidratação, até total dissolução.

As fitas foram reidratadas com 250 µL de amostra, a qual contém 600 µg de proteína, durante 10-20 horas, em temperatura ambiente, no aparato adequado para reidratação (Immobiline Dry Strip Reswelling Tray – GE Healthcare). As fitas foram cobertas com Cover Fluid (GE Healthcare) evitando-se a evaporação durante a reidratação.

Em seguida, realizou-se a focalização de acordo com as seguintes condições: 500V por 1 hora, 1000V por 1 hora, 8000V por 2 horas e 30 minutos, 8000V por 30 minutos. Após a focalização, as fitas foram retiradas do aparelho e armazenadas à temperatura de -80°C.

4.7.3.3. SDS-PAGE (Segunda dimensão)

Após a focalização isoelétrica, as fitas foram mantidas por 20 minutos em solução de equilíbrio com 100 mg DTT e, em seguida, por mais 20 minutos em outra solução de equilíbrio com 250 mg de iodacetamida, soluções de redução e alquilação, respectivamente. A segunda dimensão, que foi realizada para a separação das proteínas de acordo com a massa molecular, foi em gel de poliacrilamida 12,5 % de acordo com Laemmli, 1970. As fitas foram inseridas sobre o gel de acrilamida e fixadas com uma solução de agarose 0,5 % (m/v). A separação eletroforética foi realizada a 10 °C, sendo que no primeiro estágio foi utilizada uma corrente de 15 V por 15 minutos e, no segundo estágio, uma corrente de 30 V por gel durante, aproximadamente, 4 horas.

4.7.4. Revelação do gel pelo azul de Coomassie

Após a eletroforese, os géis controle e com perfil protéico da terbinafina e nonila, foram corados com Coomassie Azul Brilhante G-250 segundo Neuhoff et al., (1988).

4.8. Teste de citotoxicidade - MTT

A citotoxicidade do ácido protocatecuico e seus ésteres foi avaliada por MTT [-3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio]. Foram utilizados macrófagos alveolares de camundongos (AMJ2-C11) (Banco de Células do Rio de Janeiro). Estas foram cultivadas em garrafas de plástico em DMEM (Sigma[®]), suplementadas com soro fetal bovino (SFB) 10% e antibióticos sob a temperatura de 36,5 °C. A concentração de 10×10^5 células/mL foi utilizada para formação de células em monocamada. Os protocatecuatos foram mantidos em contato com as células por 24 horas. Após o período de incubação, as células foram tratadas com o reagente MTT (Sigma-Aldrich[®]) e incubadas novamente por mais 4 h. Após a formação de “cristais de formanza” adicionou-se 100 µL de isopropanol para solubilizar o precipitado e permitir a leitura do resultado, alterando a média de cor (Mosmann, 1983). A absorbância de “formazana” foi mensurada pelo leitor de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) em 560 nm. Como um teste controle positivo foi usado cisplatina.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação da atividade antifúngica dos compostos sintéticos esterificados

Na tabela 1 estão resumidos os resultados do coeficiente de partição através do log *P* (logaritmo do coeficiente de partição em um sistema bifásico) (Leal et al., 2009), atividade *in vitro* do ácido protocatecuico e seus ésteres frente às espécies de dermatófitos. Para cada protocatecuato foi calculado aos diferentes valores de CIM e CFM, estabelecendo a relação entre lipofilicidade e atividade antifúngica. Este estudo foi realizado a fim de indicar características químicas responsáveis pela atividade biológica, incluindo a importância de grupos hidroxila livres e o comprimento da cadeia lateral. O ácido protocatecuico mostrou atividade fraca contra *Trichophyton* spp. (CIMs entre 125 e 250 ug/mL) e o seu derivado acilado diacetato benzóico mostrou-se totalmente inativo (CIM \geq 250 ug/mL). No entanto, a presença dos grupos hidroxila mostrou-se ser necessária, mas não suficiente para um efeito antifúngico potente. Os ésteres mais potentes possuíam uma largura de seis a nove carbonos na cadeia alquílica lateral, como observado entre os protocatecuatos de hexila, heptila, octila e nonila. A potência aumentou com o número de carbonos na cadeia lateral até atingir um ponto máximo. Neste caso depois de nove carbonos os compostos perderam significativamente a atividade, fenômeno conhecido como efeito de corte ou “cutoff effect” (Kubo et al, 2002). Todos os resultados indicaram uma correlação clara e positiva entre os valores de CIM, comprimento da cadeia alquílica e sua contribuição para lipofilicidade. *Trichophyton mentagophytes* (**Tm2**), teve o menor valor de CIM (0,97 ug/mL). Para as cepas *T. rubrum*, o protocatecuato de heptila demonstrou um valor de MIC igual a 1,95 ug/mL. O protocatecuato de octila mostrou alta potência contra *T. rubrum* MYA 3108 (**Tr3**), exibindo um valor de CIM de 0,97 ug/mL. Para as cepas **Tr1** e **Tr2**, esse composto apresentou CIM de 1,95 e 7,8 ug/mL, respectivamente. Para o protocatecuato de nonila o melhor resultado foi mostrado para as cepas **Tr1** e **Tr3**, com a CIM de 1,95 ug/mL.

5.1.1. Avaliação da atividade antifúngica dos compostos sintéticos esterificados

Tabela 1. Tabela representativa contendo o cálculo do coeficiente de partição, a CIM e CFM dos protocatecuatos frente aos seis isolados.

Protocatecuatos	log P	R	Dermatófitos												
			Tr1		Tr2		Tr3		Tm1		Tm2		Tm3		
			CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	
Ácido protocatecuico	(1)	0,81	H	250	250	250	250	250	250	250	>250	>250	>250	125	125
Ácido 3,4-diacetoxibenzóico	(2)	0,76	-	250	250	>250	>250	>250	>250	250	250	>250	>250	250	250
Protocatecuato de metila	(3)	1,08	CH ₃	62,5	62,5	31,2	31,2	31,2	31,2	62,5	250	62,5	62,5	31,25	62,5
Protocatecuato de etila	(4)	1,41	CH ₂ CH ₃	31,2	31,2	31,2	31,2	31,2	31,2	62,5	31,2	31,2	31,25	125	
Protocatecuato de propila	(5)	1,90	(CH ₂) ₂ CH ₃	15,6	15,6	31,2	31,2	31,2	31,2	15,6	62,5	62,5	62,5	15,6	31,2
Protocatecuato de butila	(6)	2,32	(CH ₂) ₃ CH ₃	15,6	15,6	7,80	7,80	7,80	7,80	7,80	62,5	15,6	15,6	15,6	15,6
Protocatecuato de pentila	(7)	2,73	(CH ₂) ₄ CH ₃	7,80	7,80	7,80	7,80	7,80	7,80	3,90	15,6	7,80	7,80	7,80	15,6
Protocatecuato de hexila	(8)	3,15	(CH ₂) ₅ CH ₃	3,90	3,90	1,95	3,90	3,90	3,90	1,95	3,90	3,90	3,90	3,90	7,80
Protocatecuato de heptila	(9)	3,57	(CH ₂) ₆ CH ₃	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	3,90	0,97	0,97	3,90	3,90
Protocatecuato de octila	(10)	3,99	(CH ₂) ₇ CH ₃	1,95	1,95	7,80	7,80	0,97	0,97	1,95	3,90	1,95	1,95	3,90	3,90
Protocatecuato de nonila	(11)	4,40	(CH ₂) ₈ CH ₃	1,95	1,95	3,90	3,90	1,95	1,95	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90
Protocatecuato de decila	(10)	4,82	(CH ₂) ₉ CH ₃	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90	7,80	7,80	3,90	3,90	3,90	3,90
Protocatecuato de dodecila	(13)	5,65	(CH ₂) ₁₁ CH ₃	>250	>250	125	125	>250	>250	250	250	62,5	62,5	31,25	62,5
Protocatecuato de tetradecila	(14)	6,49	(CH ₂) ₁₃ CH ₃	>250	>250	125	125	>250	>250	>250	>250	125	250	>250	>250
Protocatecuato de hexadecila	(15)	7,32	(CH ₂) ₁₅ CH ₃	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Protocatecuato de octadecila	(16)	8,16	(CH ₂) ₁₇ CH ₃	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Griseofulvina			-	0,0312		0,0625		0,0625		0,0625		0,125		0,125	

Cálculo do coeficiente de partição (Log P) dos protocatecuatos; Concentração Inibitória Mínima (CIM); Concentração Fungicida Mínima (CFM), isolados clínicos de *T. rubrum* (Tr1 e Tr2); *T. rubrum* ATCC MYA 3108 (Tr3), isolados clínicos de *T. interdigitale* (Tm1 e Tm2) e *T. interdigitale* ATCC 40131 (Tm3). Os números entre parênteses são as numerações de cada composto. O teste foi realizado em quintuplicata, em experimento independente.

Os resultados revelaram que dos 16 compostos testados, 10 (62,5%) tiveram atividade potente contra dois isolados clínicos de *T. rubrum* (**Tr1 e Tr2**), *T. rubrum* MYA 3108 (**Tr3**) e **Tm1** (tabelas 2 e 3) e 11 (68,7%) contra o isolado clínico *T. interdigitale* ATCC 40131 (**Tm3**) (tabela 3). Os valores de referência de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram considerados como inferiores 62,5 µg/mL. Com relação à griseofulvina, os valores encontrados foram MIC 0,0312 µg/ml para **Tr1**; 0,0625 µg/mL para **Tr2, Tr3 e Tm1**; 0,125 µg/mL para **Tm2 e Tm3**.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima *In vitro* (CIM%) e concentração fungicida mínima (% CFM) do ácido protocatecuico e seus ésteres para **Tr1, Tr2 e Tr3**.

Dermatófitos						
	Tr1		Tr2		Tr3	
Concentrações (ug /mL)	CIM %	CFM %	CFM %	CFM %	CFM %	CFM %
0,97- 62,5	10 (62,5 %)	10 (62,6%)	10 (62,5 %)	10 (62,5%)	10 (62,5 %)	10 (62,5%)
125- 250	2 (12,5%)	2 (12,5%)	3 (18,7%)	3 (18,7%)	1 (6,25 %)	1 (6,25%)
>250	4 (25%)	4 (25%)	3 (18,7%)	3 (18,7%)	5 (31,2 %)	5 (31,2%)
Total	16 (100%)	16 (100%)	16 (100%)	16 (100%)	16 (100%)	16 (100%)

Tabela 3. Concentração inibitória mínima *In vitro* (CIM%) e concentração fungicida mínima (CFM%) do ácido protocatecuico e seus ésteres para **Tm1, Tm2 e Tm3**.

Dermatófitos						
	Tm1		Tm2		Tm3	
Concentrações (ug /mL)	CIM%	CFM %	CIM %	CFM %	CIM %	CFM %
0,97- 62,5	10 (62, 5 %)	9 (56, 2%)	11 (68,7 %)	11 (68,7%)	11 (68,7 %)	11 (68,7%)
125- 250	3 (18,7%)	3 (18,7%)	1 (6,25 %)	1 (6,25%)	2 (12,5%)	2 (12,5%)
>250	3 (18,7%)	4(25,0%)	4 (25,0%)	3 (25,0%)	3 (18,7%)	3 (18,7%)
Total	16 (100%)	16 (100%)	16 (100%)	16 (100%)	16 (100%)	16 (100%)

O espectro da atividade antifúngica de todos os compostos sintéticos dos protocatecuatos testados contra as seis linhagens de dermatófitos está demonstrada na **figura 3**, onde observou-se a atividade específica para cada linhagem de dermatófitos. Nota-se que

os valores de CIM correspondem à CFM em geral e que há uma tendência a serem mais ativos contra a espécie *T. rubrum* na concentração de 0,97-1,95 µg/mL, porém, a maioria dos compostos apresenta atividade antifúngica forte contra ambas as espécies.

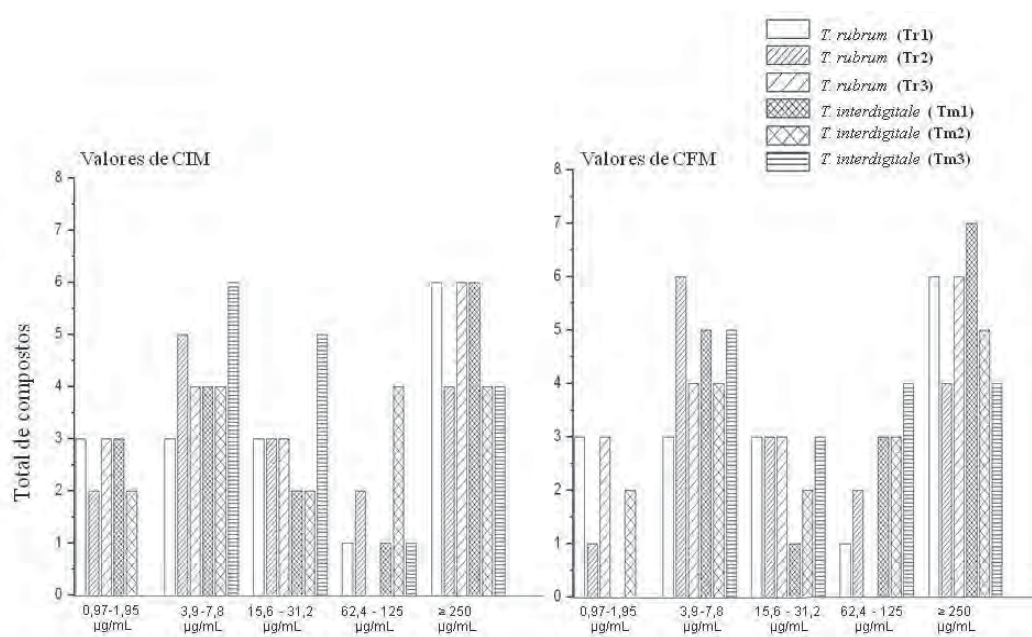


Figura 3. Valores de CIM e CFM dos protocatecuatos contra duas espécies de *Trichophyton spp.*

5.2. Avaliação da atividade combinatória de fluconazol e protocatecuatos

Os valores de CIF (concentração inibitória fracionada) de fluconazol e dos protocatecuatos de pentila (7), hexila (8), heptila (9), octila (10) e nonila (11) estão representados na tabela 4. As combinações de fluconazol e protocatecuatos de pentila, hexila, heptila, octila e nonila foram testadas frente a três linhagens de dermatófitos, por meio da técnica de checkerboard. Quando as combinações foram analisadas individualmente (tabela 4), quase todas (FLU+7; FLU+8; FLU+9; FLU+ 10; FLU+ 11) foram aditivas. A combinação FLU+8 demonstrou-se indiferente para Tr1. Para Tm2 todas as combinações foram aditivas. O protocatecuato de heptila associado ao fluconazol (FLU+ 9) demonstrou atividade sinérgica para Tm3 e aditividade para as demais associações (FLU+7; FLU+8; FLU+10 e FLU+11).

Tabela 4. Atividade de fluconazol combinado com os protocatecuatos de pentila (7), hexila (8), heptila (9), octila (10) e nonila (11) contra cepas de dermatófitos ($\mu\text{g/ml}$).

Fungos	CIM ($\mu\text{g/mL}$)						FIC index (tipo de associação)					Redução									
	Composto sozinho					Composto combinado					FLU+7	FLU+8	FLU+9	FLU+10	FLU+11	FLU+7	FLU+8	FLU+9	FLU+10	FLU+11	
	FLU	7	8	9	10	11	FLU+7	FLU+8	FLU+9	FLU+10	FLU+11	FLU+7	FLU+8	FLU+9	FLU+10	FLU+11	FLU+7	FLU+8	FLU+9	FLU+10	FLU+11
Tr1	2,0	7,8	3,9	1,9	1,9	1,9	0,12-7,80	2,00-0,48	0,12-1,9	2,00-0,06	2,00-0,03	1,0 (A)	1,1 (I)	1,0 (A)	1,0 (A)	1,0 (A)	17x 0x	0x 8x	17x 0x	0x 32x	0x 64x
Tm2	1,0	3,9	1,9	3,9	1,9	3,9	1,00-0,03	1,00-0,03	1,00-0,03	1,00-0,03	1,00-0,03	1,0 (A)	1,0 (A)	1,0 (A)	1,0 (A)	1,0 (A)	0x 129x	0x 129x	0x 129x	0x 129x	0x 129x
Tm3	0,5	7,8	3,9	3,9	3,9	3,9	0,50-0,03	0,12-1,9	0,12-0,97	0,12-1,9	0,50-0,03	1,0 (A)	0,72 (A)	0,48 (S)	0,72 (A)	1,0 (A)	0x 258x	32x 2x	32x 4x	32x 2x	0x 129x

Efeito sinérgico (S), aditivo (A), indiferente (I). Tr1- *T. rubrum*, Tm2- *T. interdigitale* isolado clínico e Tm3- *T. interdigitale* ATCC 40131.

5.3. Avaliação da atividade combinatória de *griseofulvina* e *protocatecuato de nonila*

As combinações de griseofulvina e nonila foram avaliadas contra seis linhagens de dermatófitos. O resultado da combinação de griseofulvina e protocatecuato de nonila demonstrou que houve atividade sinérgica frente a **Tr1** e **Tr2**. Para as demais linhagens **Tr3**, **Tm1**, **Tm2** e **Tm3** a associação mostrou atividade aditiva.

Tabela 5. Valores de CIM da griseofulvina e do derivado nonila testados por uso simples e combinados contra os isolados de dermatófitos ($\mu\text{g/mL}$). O índice combinado fracionado (ICIF) das duas substâncias também está representado na tabela.

CIM ($\mu\text{g/ml}$)							
Dermatófitos	CIM (composto sozinho)		CIM da combinação		FICI (interp.)	Redução	
	Griseo	11	Griseo	11		Griseo + 11	
Tr1	0,0312	3,90	0,0030	0,12	0,12 (S)	10x	32x
Tr2	0,0625	3,90	0,0300	0,03	0,48 (S)	2x	129x
Tr3	0,0625	1,95	0,0007	1,95	1,0 (A)	89 x	0x
Tm1	0,0156	3,90	0,0007	3,90	1,0 (A)	22x	0x
Tm2	0,0625	3,90	0,0007	3,90	1,0 (A)	89x	0x
Tm3	0,125	3,90	0,0007	3,90	1,0 (A)	170x	0x

Efeito sinérgico (S), aditivo (A).

5.4. Avaliação da atividade antifúngica da combinação equimolar de miconazol e protocatuatos

Os resultados da combinação equimolar de miconazol e os protocatuatos de pentila, hexila, heptila, nonila, dodecila, tetradecila, hexadecila e octadecila na proporção equimolar (1:1) estão representados na tabela 6. Quando se associou quimicamente os protocatuatos com miconazol, foram encontradas atividade antifúngica sinérgica para **Tm1**. Para **Tr1** foram encontradas duas interações aditivas (protocatuato de hexadecila + miconazol e protocatuato de octadecila + miconazol) e sinérgica para as demais associações. Para **Tm3** houve cinco atividades indiferentes (protocatuato de pentila + miconazol, protocatuato de hexila + miconazol, protocatuato de dodecila + miconazol, protocatuato de tetradecila + miconazol, protocatuato de hexadecila + miconazol), duas interações aditivas (heptila + miconazol, nonila + miconazol). Interação antagônica foi evidenciada na associação (octadecila + miconazol).

5.4.1. Avaliação da atividade antifúngica da combinação equimolar de miconazol e protocatecuatos

Tabela 6 - Atividade *in vitro* da combinação de miconazol com protocatecuatos de pentila (PEN), hexila (HEX), heptila (HEP), nonila (NON), dodecila (DOD), tetradecila (TET), hexadecila (HEX) e octadecila (OCT) contra três linhagens de dermatófitos ($\mu\text{g/mL}$).

Composto sozinho	Composto combinado						FIC índice			Redução		
	Tr1	Tm1	Tm3	Tr1	Tm1	Tm3	Tr1	Tm1	Tm3	Tr1	Tm1	Tm3
MCZ	0,25	0,25	0,25									
PEN	7,8	3,9	7,8	0,03 (MCZ) 0,03 (PEN)	0,015 (MCZ) 0,015 (PEN)	0,97 (MCZ) 0,97 (PEN)	0,12 (S)	0,06 (S)	4,0 (I)	8x 260x	16x 260x	* 8x
HEX	3,9	1,95	3,9	0,003(MCZ) 0,003(HEX)	0,03 (MCZ) 0,03 (HEX)	0,97 (MCZ) 0,97 (HEX)	0,12 (S)	0,13 (S)	4,1 (I)	83x 1.300x	8x 65x	* 4x
HEP	1,95	1,95	3,9	0,0004 (MCZ) 0,0004(HEP)	0,03 (MCZ) 0,03 (HEP)	0,97 (MCZ) 0,97 (HEP)	0,0018 (S)	0,13 (S)	4,1 (A)	625x 4.875x	8x 65x	* 4x
NON	1,95	3,9	3,9	0,03(MCZ) 0,03(NON)	0,06 (MCZ) 0,06 (NON)	0,97 (MCZ) 0,97 (NON)	0,13 (S)	0,25 (S)	4,1 (A)	8x 65x	4x 65x	* 4x
DOD	>250	7,8	31,2	0,03(MCZ) 0,03(DOD)	0,03(MCZ) 0,03 (DOD)	0,48 (MCZ) 0,48 (DOD)	0,12 (S) ^a	0,12 (S)	1,9 (I)	8x *	8x 260x	* 65x
TET	>250	>250	>250	0,015(MCZ) 0,015(TET)	0,03 (MCZ) 0,03 (TET)	0,48 (MCZ) 0,48 (TET)	0,12 (S) ^a	0,12 (S) ^a	1,92 (I) ^a	16x *	8x *	* *
HEX	>250	>250	>250	0,007(MCZ) 0,007(HEX)	0,015 (MCZ) 0,015 (HEX)	0,48 (MCZ) 0,48 (HEX)	0,084 (A) ^a	0,18 (S) ^a	1,92 (I) ^a	35x *	16x *	* *
OCT	>250	>250	>250	0,007(MCZ) 0,007(OCT)	0,03 (MCZ) 0,03 (OCT)	0,97 (MCZ) 0,97 (OCT)	0,084 (A) ^a	0,36 (S) ^a	11,6 (AN) ^a	35x *	8x *	* *

^a Para o cálculo do FIC para os compostos dodecila (somente para Tr1), tetradecila, hexadecila e octadecila foi arbitrariamente definido na concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$. Efeito sinérgico (S), aditivo (A), indiferente (I), antagônico (AN). * Dados não calculados.

5.5. Avaliação da atividade antifúngica da combinação equimolar de nistatina e protocatecuatos

Os resultados da combinação equimolar de nistatina e os protocatecuatos de pentila, hexila, heptila, nonila, dodecila, tetradecila, hexadecila e octadecila estão representados na **tabela 7**. Quando se associou quimicamente os protocatecuatos de pentila, hexila, heptila, nonila, dodecila, tetradecila, hexadecila e octadecila, foi encontrada apenas uma interação aditiva entre dodecila e nistatina contra **Tm1**, para as demais associações foram evidenciadas interações antagônicas e indiferentes contra **Tr1, Tm1 e Tm3**. Os resultados demonstraram que este polieno não possui uma melhor ação antifúngica quando associada a oito protocatecuatos diferentes.

Tabela 7. Atividade *in vitro* de nistatina com protocatecuato de pentila (PEN), hexila (HEX), heptila (HEP), nonila (NON), dodecila (DOD), tetradecila (TET), hexadecila (HEX) e octadecila (OCT) contra três linhagens de dermatófitos ($\mu\text{g/mL}$).

Composto sozinho			Composto combinado						FIC index			
B	Tr1	Tm1	Tm3	Tr1		Tm1		Tm3		Tr1	Tm1	Tm3
NIS	2,0	2,0	0,5									
PEN	7,8	3,9	7,8	1,95 (NIS)	1,95 (PEN)	3,90 (NIS)	3,90 (PEN)	3,90 (NIS)	3,90 (PEN)	1,2 (I)	2,9 (I)	8,3 (AN)
HEX	3,9	1,95	3,9	1,95 (NIS)	1,95 (HEX)	3,90 (NIS)	3,90 (HEX)	3,90 (NIS)	3,90 (HEX)	1,4(I)	3,9(I)	8,8 (AN)
HEP	1,95	1,95	3,9	1,95 (NIS)	1,95 (HEP)	3,90 (NIS)	3,90 (HEP)	3,90 (NIS)	3,90 (HEP)	1,9(I)	3,9(I)	8,8 (AN)
NON	1,95	3,9	3,9	1,95 (NIS)	1,95 (NON)	1,95 (NIS)	1,95 (NON)	3,90 (NIS)	3,90 (NON)	1,9 (I)	1,4(I)	8,8 (AN)
DOD	>250	7,8	31,2	0,97 (NIS)	0,97 (DOD)	1,95 (NIS)	1,95 (DOD)	1,95 (NIS)	1,95 (DOD)	8,2 (AN) ^a	1,0(A)	4,0 (I)
TET	>250	>250	>250	0,97 (NIS)	0,97 (TET)	3,90 (NIS)	1,95 (TET)	1,95 (NIS)	1,95 (TET)	8,2 (AN) ^a	1,98 (I) ^a	19,5 (AN) ^a
HEX	>250	>250	>250	1,95 (NIS)	1,95 (HEX)	7,80 (NIS)	7,80 (HEX)	3,90 (NIS)	3,90 (HEX)	16,6 (AN) ^a	66,3 (AN) ^a	39 (AN) ^a
OCT	>250	>250	>250	1,95 (NIS)	1,95 (OCT)	7,80 (NIS)	3,90 (OCT)	3,90 (NIS)	3,90 (OCT)	16,6 (AN) ^a	66,3 (AN) ^a	39 (AN) ^a

^a Para o cálculo do FIC para o protocatecuato de dodecila (somente para **Tr1**), tetradecila, hexadecila e octadecila foi arbitrariamente definido na concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$. Efeito sinérgico (S), aditivo (A), indiferente (I), antagônico (AN).

5.6. Resultados do ensaio de citotoxicidade dos protocatecuatos de pentila, hexila, heptila, octila e nonila

Os resultados dos ensaios para avaliação do potencial citotóxico dos protocatecuatos de pentila, hexila, heptila, octila e nonila pelo método de MTT estão representados na tabela 8. Para análise da atividade citotóxica foi determinado um valor de IC₅₀ na concentração de **7,8 ug/mL**. Como controle positivo de atividade citotóxica foi utilizada cisplatina. O valor de IC₅₀ dos protocatecuatos de pentila, hexila, heptila, octila e nonila foram 40,1 ug/mL, 33,3 ug/mL, 8,04 ug/mL, 8,90 ug/mL, 8,10 ug/mL, respectivamente. Conforme observado na tabela 8 demonstra-se a quantidade necessária para inviabilizar 50% dos macrófagos e 100% das células fúngicas. De acordo com os resultados os protocatecuatos possuem baixa citotoxicidade.

Tabela 8. Avaliação da atividade citotóxica em macrófagos alveolares e índice de seletividade a partir da relação entre o CI₅₀ e CFM.

Compostos	Citotoxicidade CI ₅₀ (µg/mL)	IS					
		Tr1	Tr2	Tr3	Tm1	Tm2	Tm3
Pentila	40,1	5,1	5,1	5,1	2,6	5,1	2,6
Hexila	33,3	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	4,2
Heptila	8,04	4,1	4,1	4,0	2,0	8,2	2,0
Octila	8,90	4,5	1,1	9,2	2,3	4,5	2,3
Nonila	8,10	4,1	2,1	4,1	2,1	2,1	2,1
cisplatina	—	—	—	—	—	—	—

IS: índice de seletividade obtido a partir da relação entre o IC₅₀ (macrófagos alveolares) por CFM para cada linhagem de dermatófito.

A concentração de **7,8 ug/mL** analisada confere com valores de **CFM** dos fungos estudados **Tr1,Tr2,Tr3,Tm1,Tm2** e **Tm3** demonstrando assim que o efeito desses protocatecuatos podem ser promissores para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas.

5.7. Resultados da avaliação do proteoma total e diferencial de *T. rubrum* nas situações de contato com as substâncias antifúngicas

5.7.1. Análise do perfil protéico por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) dos extratos proteicos totais de *T. rubrum*

Os componentes totais do fungo tratado com nonila e sem tratamento foram analisados por eletroforese SDS-PAGE. O perfil eletroforético mostrou diferenças quanto à intensidade e número de bandas. Na figura 1 é possível verificar modificações no perfil das duas situações na faixa de ≥ 97 a ≤ 14 kDa.

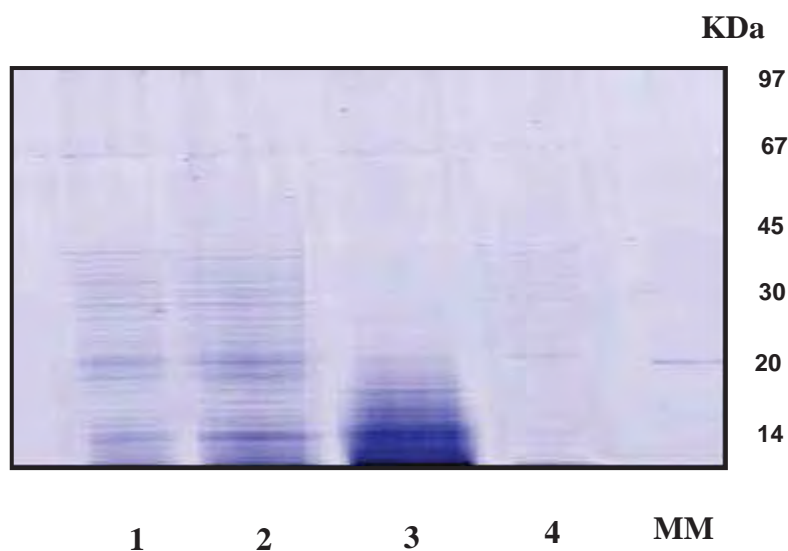


Figura 4. Componentes totais de Tr1 (1), Tm3 (2), Tr1 sem tratamento (3) e Tr1 tratado com nonila 10x (4).

5.8. Análise do proteoma total de *T. rubrum* (Tm1) por eletroforese bidimensional dos géis controle (Tm1 sem contato com substância antifúngica) e Tm1 tratado com terbinafina

A eletroforese bidimensional foi realizada com os componentes totais de *T. rubrum* sem tratamento e tratada com terbinafina. A concentração de terbinafina que produziu o efeito no proteoma deste fungo foi de 49 µg/mL. As figuras 5 e 6 mostraram as bandas selecionadas que apresentaram variações no perfil do proteoma nas diferentes situações e nas diferentes faixas de pH. Elegeu-se uma concentração 50 vezes maior que a CIM para terbinafina. Foram detectadas proteínas na eletroforese bidimensional com massas moleculares entre ≥ 80 e ≤ 9 kDa e PI entre 4 e 7. A análise diferencial da expressão em *T. rubrum* revelou em maioria diminuição na expressão das proteínas quando em contato com terbinafina. Esses dados estão descritos na tabela 9.

T. rubrum sem tratamento

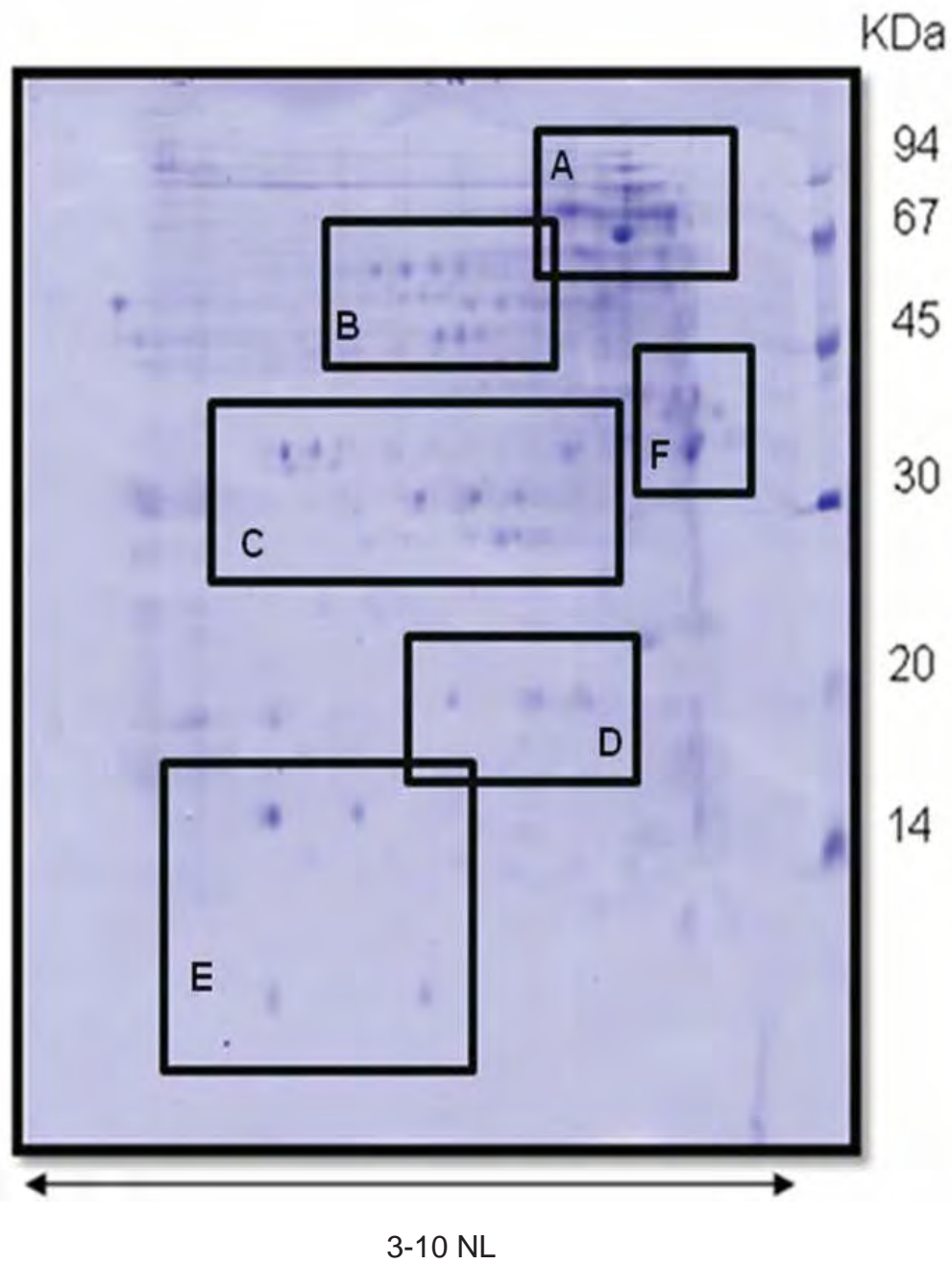


Figura 5. Eletroforese bidimensional dos componentes protéicos totais de *T. rubrum* na faixa de pH de 3 a 10 sem tratamento. Gel corado pelo azul de Coomassie.

T. rubrum tratado com terbinafina

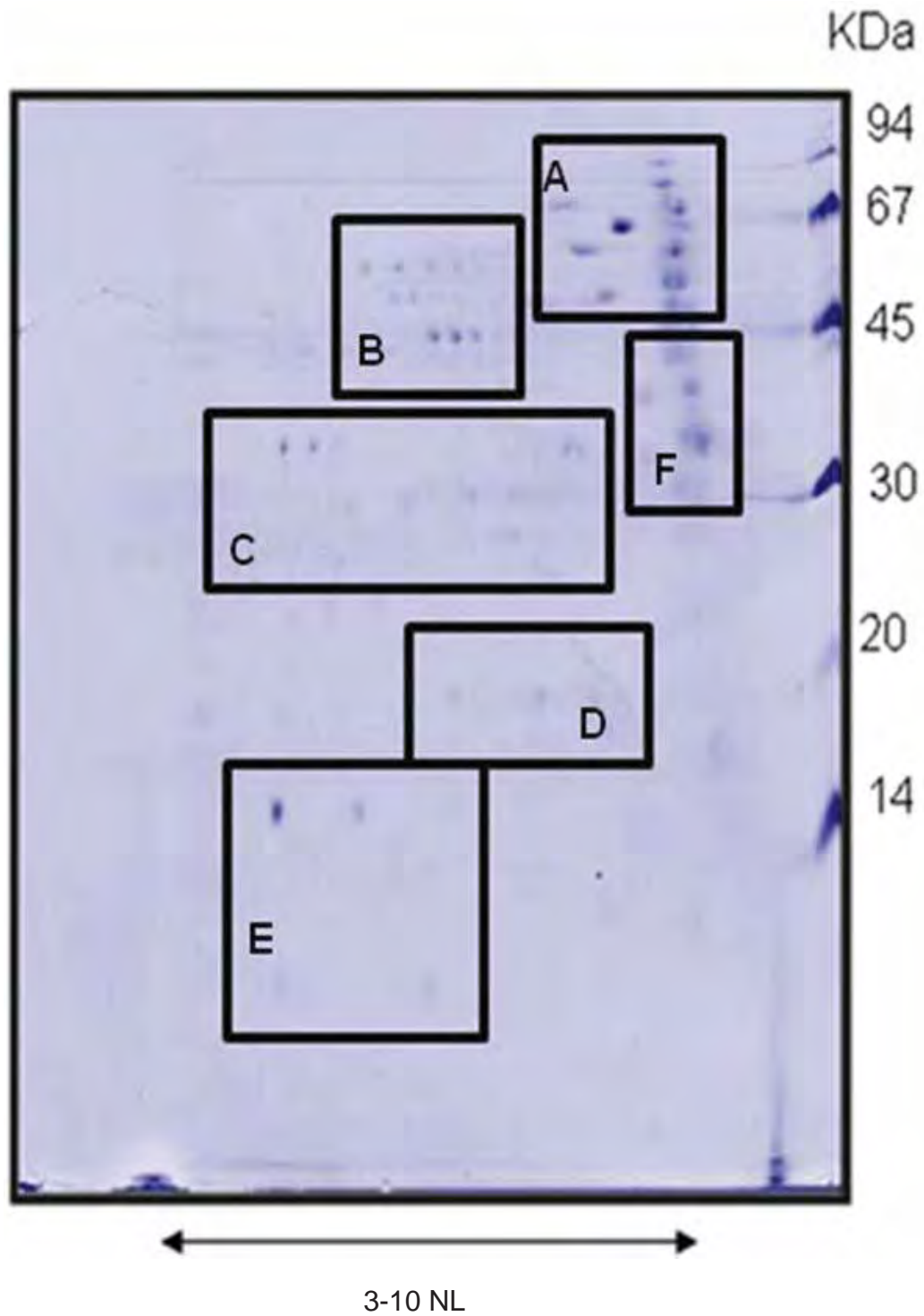


Figura 6. Eletroforese bidimensional dos componentes protéicos totais de *T. rubrum* tratado com terbinafina 50 x acima da CIM. Gel corado pelo azul de Coomassie.

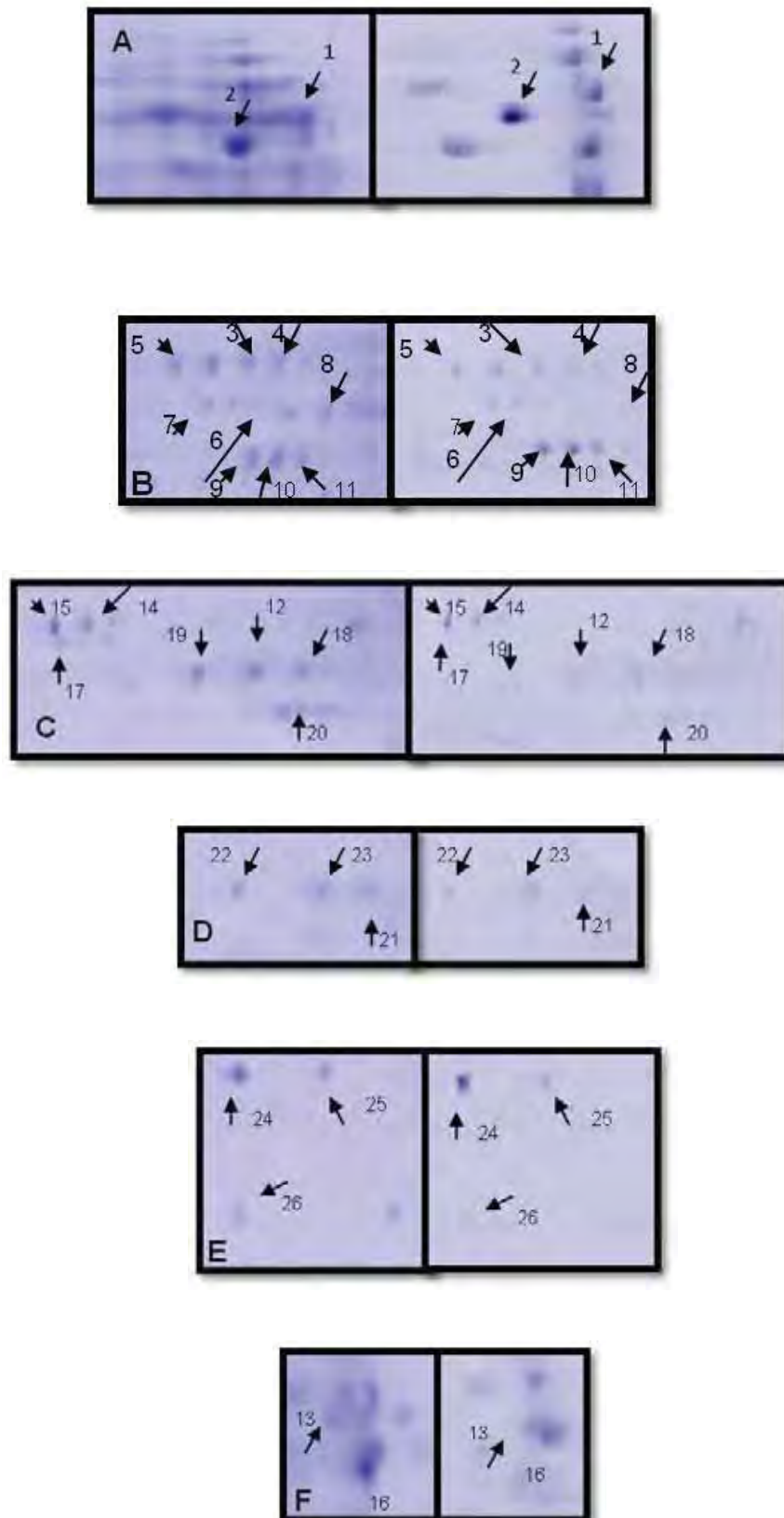


Figura 7. Eletroforese bidimensional do extrato protéico total de *T. rubrum* isolado clínico na faixa de pH de 3 a 10, comparada com *T. rubrum* tratado com terbinafina 50 x . Em A, B, C, D, E e F tem-se visão ampliada das proteínas.

5.9. Análise do perfil diferencial do controle (*Tm1* sem contato com substância antifúngica) e *Tm1* tratado com terbinafina

Foi realizada a seleção dos spots para verificação de variações de intensidade de bandas de acordo com as diferentes situações. A análise foi realizada pelo software Image Master 2D Platinum.

Tabela 9. Proteínas demonstradas na figura 7 com seus respectivos pontos isoelétricos (pI), massas moleculares (MM) e alterações observadas com o tratamento com terbinafina.

Spot	PI	MM (kDa)	Alteração de expressão
1	47045	76039	Diminuiu 1,81 vezes com terbinafina
2	49788	68389	Diminuiu 1,65 vezes com terbinafina
3	57890	58465	Diminuiu 2,63 vezes com terbinafina
4	56411	58465	Diminuiu 2,66 vezes com terbinafina
5	60057	57888	Diminuiu 1,63 vezes com terbinafina
6	58774	58465	Diminuiu 1,95 vezes com terbinafina
7	58869	51143	Diminuiu 1,71 vezes com terbinafina
8	55663	51143	Diminuiu 3,04 vezes com terbinafina
9	57781	43970	Aumentou 1,08 vezes com terbinafina
10	56512	43536	Diminuiu 1,2 vezes com terbinafina
11	55727	44408	Diminuiu 1,06 vezes com terbinafina
12	54025	19682	Diminuiu 1,95 vezes com terbinafina
13	46523	38259	Diminuiu 44,5 vezes com terbinafina
14	63260	34449	Diminuiu 1,36 vezes com terbinafina

15	66481	34285	Diminuiu 1,6 vezes com terbinafina
16	45739	34122	Diminuiu 9,08 vezes com terbinafina
17	65857	33041	Diminuiu 7,29 vezes com terbinafina
18	55848	31278	Diminuiu 2,59 vezes com terbinafina
19	58405	31018	Diminuiu 2,77 vezes com terbinafina
20	58400	28560	Diminuiu 1,97 vezes com terbinafina
21	58400	28560	Diminuiu 2,52 vezes com terbinafina
22	56959	19787	Diminuiu 1,78 vezes com terbinafina
23	54025	19682	Diminuiu 1,95 vezes com terbinafina
24	68212	15168	Diminuiu 1,01 vezes com terbinafina
25	60839	15311	Diminuiu 1,11 vezes com terbinafina
26	68212	9866	Diminuiu 1,85 vezes com terbinafina

5.10. Análise protéica por eletroforese bidimensional controle (*Tm1* sem contato com substância antifúngica) e *Tm1* tratado com protocatecuato de nonila

A eletroforese bidimensional foi também realizada com os componentes protéicos totais de *T. rubrum* sem tratamento (figura 8) e comparada com o tratado com o protocatecuato nonila (figura 9) para verificar a diferença de expressão de proteínas e seus respectivos pontos isoelétricos (pIs) e massas moleculares. A concentração de nonila que produziu o efeito no proteoma deste fungo foi 19,5 µg/mL. Elegeram-se uma concentração 10 vezes maior que a concentração inibitória mínima para nonila. Foram detectadas proteínas com massas moleculares entre ≥ 43 e ≤ 13 kDA e PI entre 5 e 6. A análise diferencial da expressão protéica de *T. rubrum* revelou uma diminuição na expressão geral das proteínas quando em contato com o protocatecuato de nonila (figura 10). Na figura 10, para o controle foi selecionada uma região (A) que abrangeu 12 spots, região (B) 9 spots, região (C) 3 spots e região (D) 2 spots. Quando adicionado o éster, todas as regiões tiveram spots com expressão diferenciada como visto na região (A) spot 1 houve uma diminuição de 2,19 vezes, na região (B) spot 2 houve um aumento de 2,98 vezes, para os demais spots da região B e incluindo as regiões C e D os spots selecionados tiveram uma diminuição que ficou entre 1,16 a 1,30 vezes. Os dados diferenciais da expressão dos spots nas duas situações estão descritos na tabela 10.

T. rubrum sem tratamento

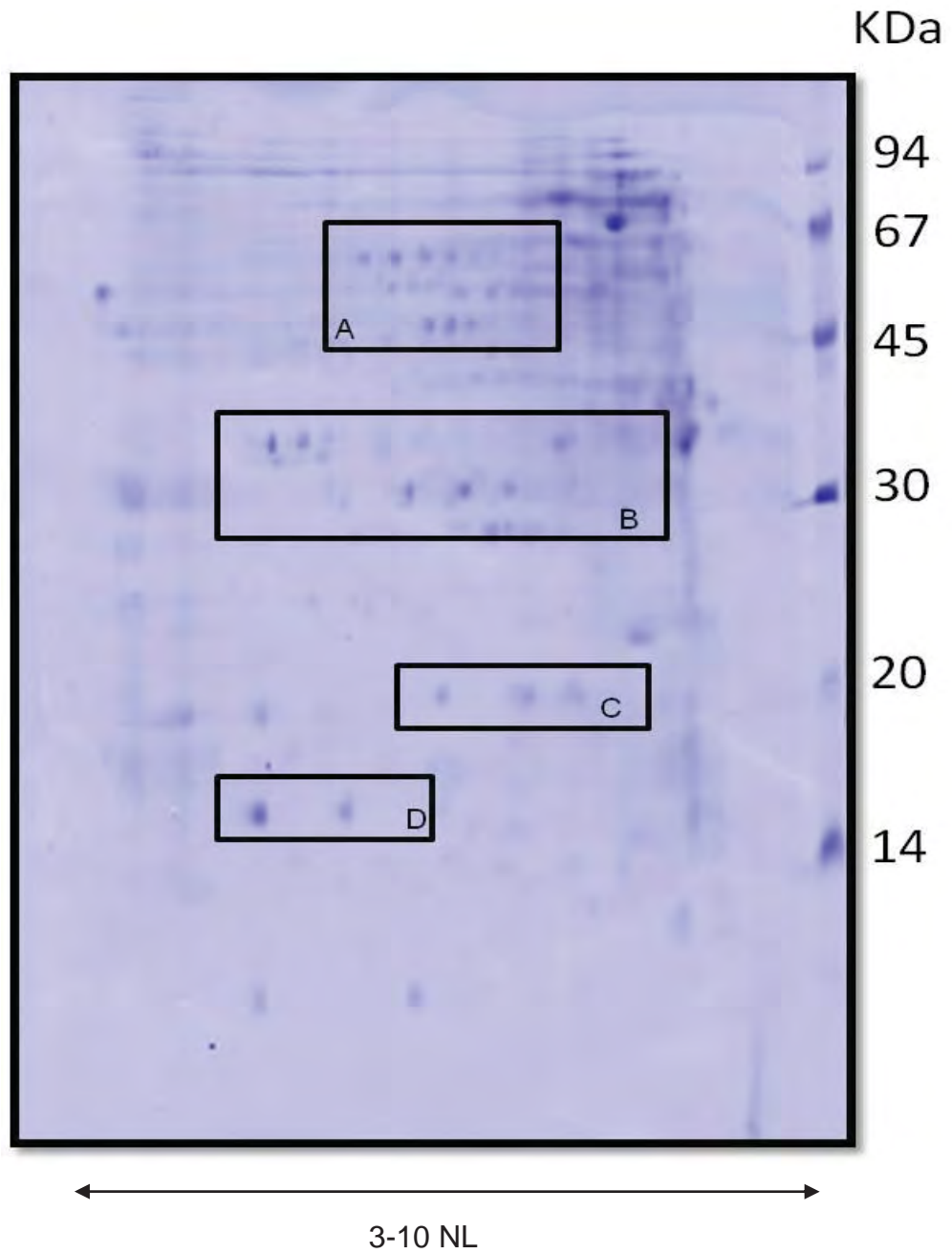


Figura 8. Eletroforese bidimensional dos componentes protéicos totais de *T. rubrum* na faixa de pH de 3 a 10 sem tratamento. Gel corado pelo azul de Coomassie.

T. rubrum tratado com nonila

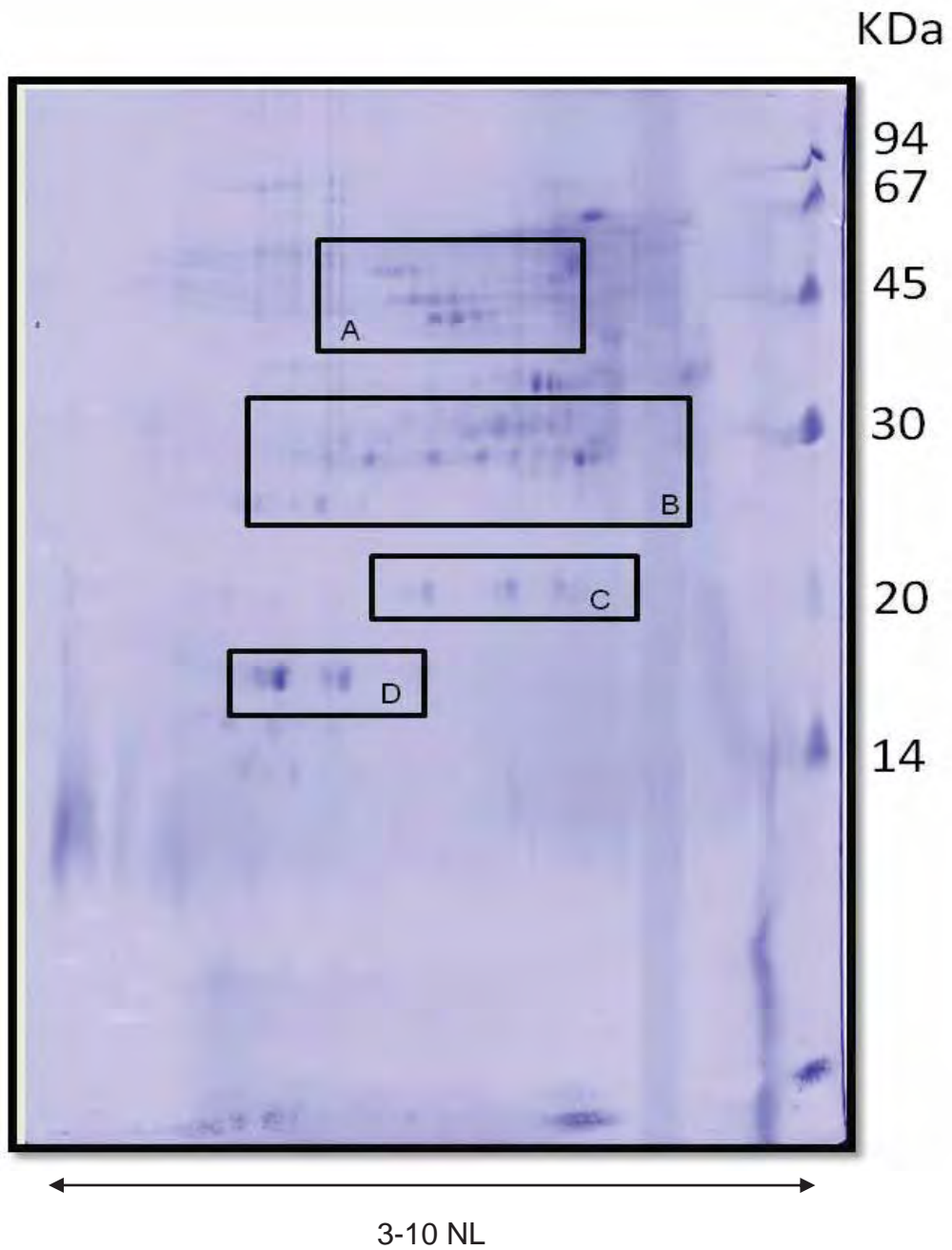


Figura 9. Eletroforese bidimensional dos componentes protéicos totais de *T. rubrum* tratado com nonila 10 x acima da CIM. Gel corado pelo azul de Coomassie.

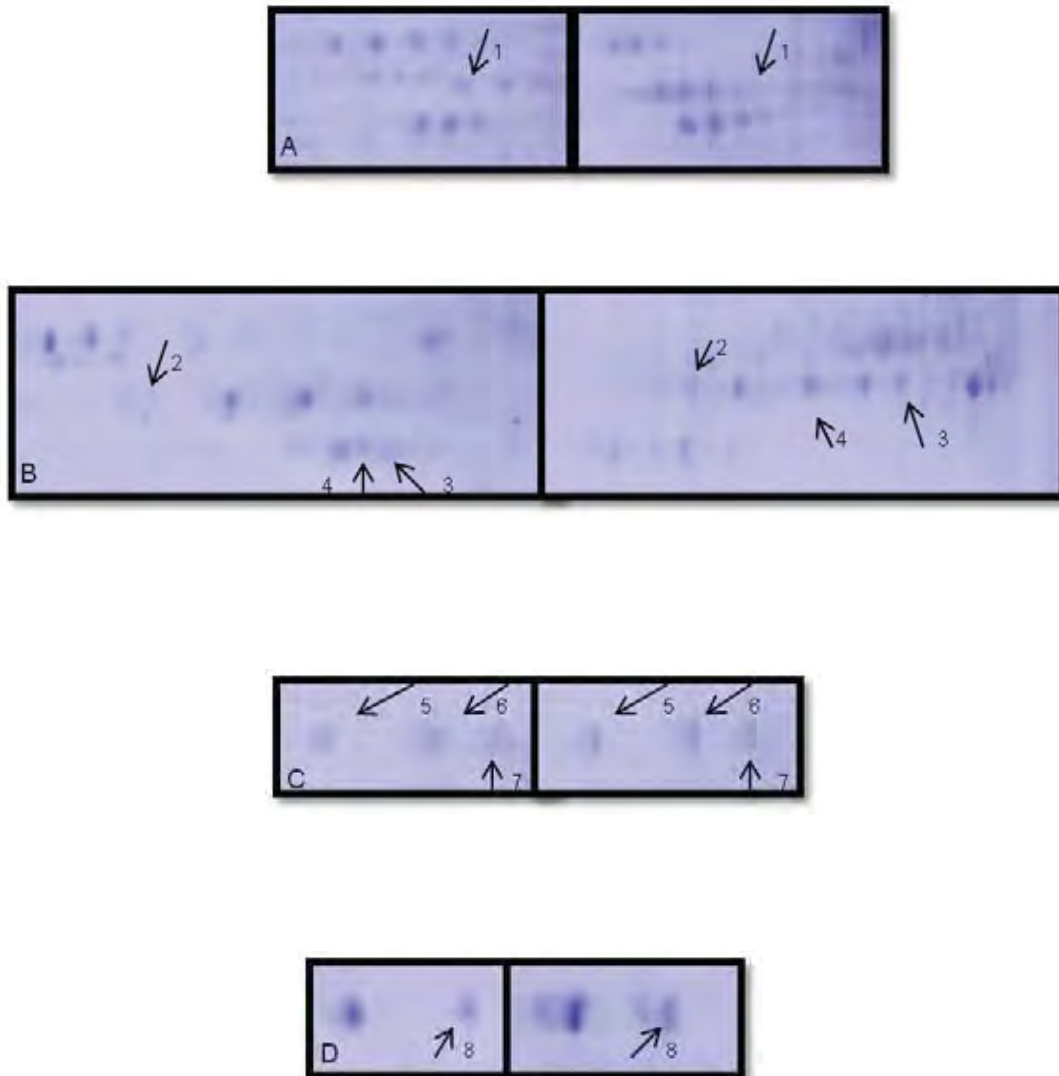


Figura 10. Eletroforese bidimensional do extrato protéico total de *T. rubrum* isolado clínico na faixa de pH de 3 a 10, comparada com *T. rubrum* tratado com protocatuato de nonila 10 x . Em A, B, C e D têm-se visão ampliada das proteínas.

5.11. *Análise do perfil diferencial do gel controle e gel tratado com nonila*

Tabela 10. Proteínas demonstradas na figura 10 com seus respectivos pontos isoelétricos (pI), massas moleculares (MM) e alterações observadas com o tratamento com nonila.

Spot	pI	MM (kDa)	Alteração de expressão
1	55263	42342	Diminuiu 2,19 vezes com nonila
2	60931	25091	Aumentou 2,98 vezes com nonila
3	54600	23659	Aumentou 1,30 vezes com nonila
4	55303	23296	Diminuiu 1,16 vezes com nonila
5	56849	16372	Diminuiu 1,21 vezes com nonila
6	53650	16372	Diminuiu 1,21 vezes com nonila
7	52201	16451	Diminuiu 1,26 vezes com nonila
8	60770	13033	Aumentou 1,24 vezes com nonila

6. DISCUSSÃO

O ácido protocatecuico (ácido 3,4-dihidroxibenzóico) é conhecido por apresentar atividade antioxidante, anticancerígena e cardioprotetora (Reis et al., 2010). Produtos naturais representam uma excelente fonte de novas entidades químicas para a busca e otimização de compostos antimicrobianos (Barret, 2002). Um novo fármaco de origem natural é submetido a otimizações farmacológicas, por meio de modificações estruturais (Nussbaum et al., 2006).

A série de protocatecuatos foi sintetizada e testada quanto a sua atividade antifúngica contra seis linhagens de *Trichophyton*.

Os resultados mostraram que os derivados sintéticos do ácido protocatecuico foram capazes de inibir, *in vitro*, todas as linhagens estudadas. Os valores de CIM e CFM estão próximos, sugerindo comportamento fungicida (Tabela 1). Todos os protocatecuatos testados diferem no tamanho de cadeia de carbono, os dados são interpretados como significativos, pois as alterações na porção hidrofóbica desses ésteres estão relacionadas com sua atividade antifúngica. A melhor atividade antifúngica foi expressa pelos protocatecuatos de pentila, hexila, heptila, octila e nonila para todas as seis linhagens de dermatófitos testadas. O fenômeno de corte na inibição do crescimento (CIM) e efeito fungicida (CFM) foi observado entre os protocatecuatos decila e dodecila. Os resultados indicaram uma evidente correlação entre os valores de CIM, comprimento da cadeia alquílica e contribuição para lipofilicidade. Kubo et al., 2002, verificou que o máximo de atividade encontrada foi para o galato de decila (CIM = 12,5 µg/mL), e que a cadeia alquílica maior, os ésteres foram inativos, ocorrendo o fenômeno de corte. A atividade antifúngica dos galatos, neste estudo, é dependente da subunidade catecólica, juntamente com a cadeia alquílica hidrofóbica. Neihei et al., 2004 avaliaram a série de alquila diidroxibenzoatos (protocatecuatos) e sua atividade fungicida contra *Saccharomyces cerevisiae*. Os protocatecuato nonila e octila foram mais eficazes contra esta levedura com a CFM de no mínimo 12,5 µg/mL. A atividade se correlacionou com o comprimento da cadeia alquílica. Leal e colaboradores estudaram a atividade antifúngica de uma série de ácido gálico e seus análogos correlacionando a atividade antifúngica desses compostos à importância do grupamento hidroxila, influência do comprimento da cadeia e hidrofobicidade dos galatos (Leal et al., 2009).

O arsenal antifúngico para o tratamento de infecções fúngicas continua a ser limitado. Uma abordagem possível para superar a resistência de drogas antifúngicas é combinar duas ou

três classes de antifúngicos, especialmente se as drogas têm diferentes mecanismos de ação (Varquez et al., 2007).

Nós investigamos a atividade aditiva, sinérgica, indiferente ou antagônica de protocatecuatos em combinação com fluconazol e griseofulvina (tabelas 4 e 5). A combinação fluconazol e os protocatecuatos de pentila, hexila, heptila, octila e nonila foi aditiva para os isolados clínicos *T. rubrum* (Tr1), *T. interdigitale* (Tm1) e *T. interdigitale* ATCC 40131 (Tm3) (FICI = 0,75-1,0), exceto a combinação com fluconazol mais protocatecuato de heptila, que revelou um efeito sinérgico contra Tm3 (FICI = 0,49).

A eficácia do fluconazol foi melhorada utilizando a terapia combinada (Ahmad et al., 2010). Spitezer et al., 2011 testou uma biblioteca de compostos bioativos com fluconazol contra espécies de fungos patogênicos. Compostos não reconhecidos na clínica como agentes antifúngicos causou inibição potente do crescimento em conjunto com fluconazol. Aala e colaboradores (2010) encontraram atividade potente entre alicina em combinação com fluconazol ou cetoconazol, com demonstração de interação sinérgica ou aditiva contra dermatófitos. Galgóczy et al., 2008 avaliaram a atividade antifúngica *in vitro* contra cepas de dermatófitos combinando a proteína (PAF) de *Penicillium chrysogenum* com fluconazol (FCZ). PAF e FCZ agiram sinergicamente e/ou aditivamente em todos os fungos testados, exceto *M. gypseum*, onde não foram detectadas interações. De acordo com Kobayashi et al., 2011 a combinação de lactoferrina com fluconazol demonstrou atividade sinérgica contra cepas resistentes de *Candida albicans*.

Neste trabalho, interações sinérgicas foram encontradas *in vitro* entre griseofulvina e o protocatecuato de nonila contra dois isolados clínicos de *T. rubrum* (Tr1 e Tr2). O cálculo do ensaio do tabuleiro de xadrez de microtitulação (FICI) foi de 0,12 e 0,48 para dois isolados clínicos de *T. rubrum*, respectivamente. O efeito sinérgico (ou sinergismo) pode permitir a utilização de doses mais baixas de agentes individuais, agindo assim de forma mais eficaz e segura (Gupta et al., 2003). Em busca de novas combinações de antifúngicas, Biavatti et al., 2009 investigaram 30 fármacos, que foram combinados em pares, nove são usados como fungicidas e 21 são usados para outras indicações. Foram identificadas 435 combinações possíveis com 22 combinações sinérgicas, dos quais nenhum era conhecido como agentes antifúngicos. Novos ensaios terapêuticos são importantes para desvendar os dados biológicos e, portanto, resultar na descoberta de uma nova combinação de drogas (Borisy et al., 2003).

Devido à falta de novas classes de fármaco ou diferentes alvos moleculares, combinações de drogas pode ser uma importante estratégia para a terapia antifúngica (Endo et al., 2010). Nosso estudo investigou a combinação equimolar entre protocatecuatos e miconazol contra três

linhagens de dermatófitos. Foram encontradas interações sinérgicas e aditivas. Wei et al., 2011 investigou a atividade antimicótica da planta berberina (BBR), isoladamente e em combinação com miconazol (MCZ) e fluconazol (FCZ). Foi observado sinergismo entre BBR e MCZ ou FCZ. A avaliação combinatória de drogas conhecidas define uma estratégia para a descoberta de novas estratégias terapêuticas (Spitzezer et al., 2011). Foi também testado associação entre os protocatecuatos e o antifúngico nistatina contra linhagens de dermatófitos. Os resultados demonstraram que este polieno não possui uma melhor ação antifúngica quando associada aos oito ésteres do ácido protocatecuico.

A combinação ideal de drogas se dá quando há interações sinérgicas. No entanto, mesmo na ausência de sinergismo, pode haver outros possíveis benefícios da terapia combinatória. Por exemplo, a combinação de duas drogas pode aumentar a taxa de morte microbiana e encurtar a duração do tratamento. Como também, a combinação de duas drogas, que exercem seus efeitos através de dois mecanismos diferentes, o que poderia evitar o aparecimento de resistência e ampliar o espectro da atividade da associação. Além disso, com as combinações antifúngicas, a terapia combinada poderá apresentar toxicidade reduzida (ZHU et al., 2004).

A tabela 8 resume o índice de seletividade obtido a partir da relação entre o IC_{50} (macrófagos peritoneais murinos) por CFM para cada dermatófito. Os resultados encontrados no estudo analisando o IS dos ésteres sobre a cepas de dermatófitos demonstram que os compostos possuem baixa ação tóxica, o que é indispensável no caso de um tratamento seguro. Estudos de toxicidade auxiliam na triagem de uma grande variedade de compostos com atividade biológica para definir seu potencial de aplicação terapêutica mensurando a toxicidade apresentada dos fármacos (Carvalho et al., 2002).

O termo proteoma foi cunhado por Wilkins e Williams como significando o conjunto de todas as proteínas expressas por um genoma (Wilkins et al., 1996).

Proteômica pode ser vista como uma metodologia de seleção da biologia molecular, a qual tem como objetivo documentar a distribuição geral de proteínas celulares, identificando e caracterizando proteínas individuais de interesse e elucidando as suas associações e funções. Sendo assim, proteômica fundamenta-se em princípios bioquímicos, biofísicos e de bioinformática para quantificar e identificar as proteínas expressas, pois elas se alteram conforme o desenvolvimento de um organismo assim como em resposta aos fatores do ambiente (Wilkins et al., 1996).

A proteômica pode ser aplicada em diversas áreas de interesse como, por exemplo, na investigação de marcadores moleculares em determinadas doenças indicando a resposta da célula ou tecido a stress externos. Por meio da proteômica pode-se fazer uma comparação do

perfil protéico de uma célula tumoral com o de uma célula sadia, ou de uma célula cujo portador está sob tratamento médico.

Várias pesquisas têm sido conduzidas no mundo, na área da saúde, para o estudo do proteoma do fígado, rim e para diferentes organismos, como *Mycobacterium tuberculosis*, *Plasmodium falciparum* e *Helicobacter pylori*, entre outros patógenos humanos. Nosso laboratório tem reunido esforços acerca de estudos proteômicos, para o entendimento da ação dos extratos de plantas com atividade sobre células fúngicas. Scorzoni (2008) estudou a ação dos extratos acetato de etila e etanólico *Kielmeyera rubriflora* e do fluconazol no perfil proteômico de *Candida albicans* e *Candida krusei*, empregando eletroforese bidimensional. Nas duas leveduras foram observadas várias alterações na expressão de proteínas. Em *C. albicans* tratada com fluconazol foram observadas nove alterações na expressão de proteínas e em *C. krusei* 11 modificações, já com ambos os extratos verificou-se aumento ou diminuição de 66 proteínas. Aparentemente, ambos os extratos foram mais eficientes para alteração da expressão protéica de *C. krusei*, sugerindo a existência de alvos específicos. Leite, 2010 observou que várias proteínas tiveram expressão diferenciada quando *C. neoformans* ATCC 90012 foi tratado com pedaltina de *Pterogyne nitens*, bem com o fluconazol. O mesmo ocorreu quando foi comparado o perfil protéico da cepa ATCC com o isolado clínico resistente a fluconazol.

Utilizando abordagem proteômica, os extratos totais de *T. rubrum* sem tratamento, tratado com terbinafina e protocatecuato de nonila foram avaliados. A concentração de terbinafina que produziu um efeito significativo no proteoma deste fungo foi 49 µg/mL, e para protocatecuato de nonila foi 19,5 µg/mL. Neste estudo, procurou-se verificar quais proteínas estariam envolvidas na resposta do fungo *T. rubrum* frente à terbinafina e ao protocatecuato de nonila. Existe uma crescente necessidade de se obter drogas efetivas contra novos alvos, sendo as proteínas potenciais alvos na descoberta de novas drogas. A análise das proteínas, obtidas pelo software Image Master 2D Platinum resultou na detecção de 168 spots com massa molecular (MM) entre 80 e 9 kDa, e pontos isoeletricos compreendendo a faixa 4 a 7. Após o contato de *T. rubrum* com terbinafina, foram reveladas modificações na expressão de 26 proteínas, a maioria tiveram diminuição na expressão. Foi também realizado o tratamento com os componentes protéicos com o protocatecuato de nonila, onde se revelaram modificações na expressão de oito proteínas, com massas moleculares entre ≥ 43 e ≤ 13 kDa e PI entre 5 e 6. Este fato pode ser ocasionado devido ao estresse provocado pelo contato com o composto, sugerindo assim um provável mecanismo de defesa do fungo. Assim seus alvos protéicos poderiam ser evidenciados. Estas provavelmente se constituem de alvos

importantes, sendo necessário o sequenciamento dos *spots* em prioridade. Estudos posteriores a respeito da identificação e funcionalidade destas proteínas seriam extremamente importantes para se verificar se estas são essenciais ao fungo, constituindo-se, portanto possíveis alvos. Leng, 2008, analisou o proteoma dos conídios de *T. rubrum* e foi identificado um total de 1026 proteínas. Todas as proteínas identificadas foram comparadas com as do banco de dados NCBI. A classificação funcional revelou que as proteínas identificadas estão envolvidas em quase todos os principais processos biológicos. Algumas proteínas específicas e esporos foram correlacionados à sobrevivência e dispersão de conídios de *T. rubrum*, e muitas proteínas são importantes para a germinação de conídios e resposta às condições ambientais. Os resultados sugerem que o proteoma dos conídios *T. rubrum* é consideravelmente complexo, sendo caminho para um estudo mais aprofundado dos mecanismos moleculares da germinação de conídios *T. rubrum* e a manutenção da dormência de conídios.

No geral, nossos resultados podem contribuir com informações sobre testes sensibilidade e sinergismo de dermatófitos *in vitro*, visando o desenvolvimento e otimização de fármacos antifúngicos. A identificação pontual das proteínas alvos de *T. rubrum* apontadas neste estudo é de fundamental importância para o entendimento das bases moleculares e mecanismo de ação das agentes antifúngicos incluindo protocatecuatos. Os avanços para obtenção da formulação estrutural de novos agentes antifúngicos foram evidentes diante de nossos resultados. Consideramos que estes protocatecuatos, principalmente pentila e nonila são os candidatos para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos propostos para a terapêutica combinada, incluindo as dermatofitoses causadas por *T. rubrum* e *T. interdigitale*.

7. CONCLUSÕES

Por meio da análise dos resultados obtidos com o presente estudo, pode-se concluir que:

- Os derivados sintéticos do ácido protocatecuico foram capazes de inibir, *in vitro*, o crescimento das espécies *T. rubrum* e *T. interdigitale*, sendo evidenciado comportamento fungicida;
- A capacidade antifúngica dos protocatecuatos é dependente do tamanho da cadeia de seus ésteres alquílicos e sua conseqüente lipofilia;
- As melhores atividades antifúngicas foram expressas pelos protocatecuatos de pentila, hexila, heptila, octila e nonila;
- De acordo com resultados prévios a associação fluconazol e protocatecuato de heptila, revelou um efeito sinérgico contra o fungo *T. interdigitale* (Tm3);
- A combinação de griseofulvina e protocatecuato de nonila se mostrou sinérgica para o *T. rubrum* (Tr1 e Tr2);
- Para **Tr1** foram encontradas duas interações aditivas (protocatecuato de hexadecila + miconazol e octadecila + miconazol) e sinérgica para as demais associações, evidenciando por suas associações equimolares;
- A associação entre os protocatecuatos e nistatina evidenciou interações antagônicas e indiferentes;
- Os protocatecuatos de hexila, pentila, nonila, octila não demonstraram efeito citotóxico na concentração de 7,8 µg/mL, demonstrando que os protocatecuatos possuem baixa toxicidade;
- A concentração de terbinafina que produziu o efeito no proteoma de *T. rubrum* foi de 49 µg/mL, apresentando 26 proteínas diferencialmente expressas de forma mais significativa;
- A concentração do protocatecuato de nonila que produziu o efeito no proteoma em *T. rubrum* foi de 19,5 µg/mL, apresentando oito proteínas diferencialmente expressas de forma significativa;
- Estudos acerca da toxicidade *in vitro*, demonstraram que o emprego dos protocatecuatos pode ser promissor para o desenvolvimento de novos protótipos, visando à otimização de novos fármacos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aala, F.; Yusuf, U.K.; Khodavandi, A.; Jamal, F. *In vitro* antifungal activity of allicin alone and in combination with two medications against six dermatophytic fungi. **Afr. J. Microbiol.**, Vol. 5, p. 380, 2010.

Abdel-Rahman, S.M. Polymorphic exocellular protease expression in clinical isolates of *Trichophyton tonsurans*. **Mycopathol.**, v. 150, p.117, 2000.

Acero, F.J.; Carbú M.; El-Akhal, M.R.; Garrido, C.; González-Rodríguez, V.E.; Cantoral, J.M. Development of proteomics-based fungicides: new strategies for environmentally friendly control of fungal plant diseases. **Int. J. Mol. Sci.**, v.21, p.795, 2011.

Adams, L.S.; Seeram, N.P.; Hardy, M.L.; Carpenter, C.; Heber D. Analysis of the interactions of botanical extract combinations against the viability of prostate cancer cell lines. **Alternat. Med.**, v.1, p.117, 2006.

Ahmad A.; Khan A.; Khan, L.A.; Manzoor, N. In vitro synergy of eugenol and methyleugenol with fluconazole against clinical *Candida* isolates. **J. Medical Microbiol.**, v. 59, p. 1178, 2010.

Akcaglar, S.; Ener, B.; Toker, S.C.; Ediz, B, Tunali S.; Tore O. A comparative study of dermatophyte infections in Bursa, Turkey. **Med. Mycol.**, v. 65, p. 55, 2011.

Alanís-Garza, B.A.; González-González G.M.; Salazar-Aranda, R, Waksman Torres N, Anderson, L.; Seilhamer, J. A. A comparison of select mRNA and protein abundance in human liver. **Electrophor.**, v. 18, p. 533, 1997.

Asif, A. R.; Oellerich, M.; Armstrong, V. W.; Riemenschneider, B.; Monod, M.; Reichard, U. Proteome of conidial surface associated proteins of *Aspergillus fumigatus* reflecting potential vaccine candidates and allergens. **J. Proteome. Res.**, v. 5, p. 954, 2006.

Baeza, L. C.; Bailão, A. M.; Borges, C. L.; Pereira, M.; Soares, C.M.A.; M. J.; Giannini, M.J.S.M. cDNA representational difference analysis used in the identification of genes

expressed by *Trichophyton rubrum* during contact with keratin. **Microbes. Infect.**, v. 9, p. 1415, 2007.

Barrett, D. From natural products to clinically useful antifungals. Review. **Biochim. biophys. Acta.**, v. 1587, p. 224, 2002.

Biavatti, M. W. Synergy: an old wisdom, a new paradigm for pharmacotherapy. **Braz. J. Pharm. Sci.**, vol.45, p. 371, 2009.

Borisy, A. A.; Elliott, P. J.; Hurst, N. W.; Lee, M. S.; Lehar, J.; Price, E. R.; Serbedzija, G.; Zimmermann, G. R.; Foley, M. A.; Brent, R. S.; Keith, C. T. Systematic discovery of multicomponent therapeutics. **Pharmacol.**, p. 7977, v. 100, 2003.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Bioch.**, v. 72, p. 248, 1976.

Brasch J. Current knowledge of host response in human tinea. **Mycoses**, v.52, p, 304, 2009.

Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília, DF, 2006.

Burmester, A.; Shelest, E.; Gloeckner, G.; Heddergott, C.; Schindler, S.; Staib, P.; Heidel, A.; Felder, M.; Petzold, A.; Szafranski, K.; Feuermann, M.; Pedruzzi, I.; Priebe S.; Groth, M.; Winkler, R.; Li, W.; Kniemeyer, O.; Schroeckh, V.; Hertweck, C.; Hube, B.; White, T.C.; Platzer, M.; Guthke, R.; Heitman, J.; Woestermeyer, J.; Zipfel, P.F.; Monod, M. Comparative and functional genomics provide insights into the pathogenicity of dermatophytic fungi. **Genome Biol.**, v.12, p. 1-16, 2011.

Butler, M.S. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. **Nat. Prod. Rep.**, v. 22, p.162, 2005.

Cabañes, F.J. Emerging mycotoxins: introduction. **Rev. Iberoam. Micol.**,v. 2, p. 61, 2000.

Caldelari, I.; Loeliger, B.; Langen, H.; Glauser, M.P.; Moreillon, P. Deregulation of the arginine deiminase (arc) operon in penicillin-tolerant mutants of *Streptococcus gordonii*. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 44, p. 2802, 2000.

Cantón, R.; Cobo, J. Hospital antibiotic use and resistance: a relationship that is difficult to measure and complex to interpret. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v. 8, p. 437, 2009.

Carvalho, J.L.; Hernández-Inca, S. L.; Pérez, P.; Garcia-Grávalos, M.D.A. Comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnol.**, v. 2, p. 17, 2002.

Carrillo-Muñoz, A. J.; Giusiano, G.; Ezkurra, P. A.; Quindós, G. Antifungal agents: Mode of action in yeast cells. **Rev. Esp. Quimioterap.**, v.19, p.130, 2006.

Chuang, P. H.; Lee, C. W.; Chou, J.Y.; Murugan, M.; Shieh, B. J.; Chen, H. M. Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. **Bioresor. Technol.**, v. 98, p. 232, 2007.

CLSI. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Proposed Guideline. **CLSI document M44-A2**. Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute 2009.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. **CLSI document M38-A**. Wayne, Pa: *Clinical and Laboratory Standards Institute* 2002.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard-second edition. **CLSI document M38-A2**. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute 2008.

Colombo, A. L.; Barchiesi, F.; Mcgough, D. A.; Rinaldi, M. G. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, p. 535, 1995.

CSLI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard- Third Edition. **CLSI document M27-A3**. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute 2008.

CSLI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Third Informational supplement. **CLSI document M27-S3**. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute 2008.

Cuenca-Estrella M. Combinations of antifungal agents in therapy--what value are they? **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 5, p. 854, 2004.

Dolenc-Voljc, M. Dermatophyte infections in the Ljubljana region, Slovenia, 1995-2002. **Mycosis**, v. 48, p. 181, 2005.

Endo, E. H.; Cortez, D. A. G.; Nakamura, T. U.; Nakamura, C. V.; Filho, B. P. D.; Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. **Res. Microbiol.**, v. 161, p. 534, 2010.

Erbagci Z. Topical therapy for dermatophytoses: should corticosteroids be included? Review. **Am. J. Clin. Dermatol.**, v. 6, p. 375, 2004.

Espinel-Ingroff, A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 25, p. 101, 2008.

Fachin, A.L.; Ferreira-Nozawa, M.S.; Maccheroni, W. Jr.; Martinez-Rossi, N.M. Role of the ABC transporter TruMDR2 in terbinafine, 4-nitroquinoline *N*-oxide and ethidium bromide susceptibility in *Trichophyton rubrum*. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, p. 1093, 2006.

Favel, A.; Liebermann, M.; Michel-Nguyen, A., Regli, P. Fluconazole susceptibility testing of *Candida* species: a comparative study of RPMI, high resolution and casitone media. **J. Mycol. Med.**, v.5, p.7, 1995.

Fernández-Torres, B., Carrilho, A.J.; Martín, E.; Del Palacio, A.; Moore, M.K.; Valverde, A.; Serrano, M.; Guarro, J. *In Vitro* Activities of 10 Antifungal Drugs against 508 Dermatophyte Strains. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 9, p. 2524, 2001.

Fernández-Torres, B.; Inza, I.; Guarro, J. *In vitro* activities of the new antifungal drug eberconazole and three other topical agents against 200 strains of dermatophytes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 5209, 2003..

Galgiani, J.N.; Rinaldi M.G.; Polak, A.M.; Pfaller, M. A. Standardization of fungal susceptibility testing. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 30, p. 213, 1992.

Galgóczy, L.; Papp, T.; Pócsi, I.; Hegedus, N.; Vágvolgyi. In vitro activity of *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) and its combination with fluconazole against different dermatophytes. **Anton. Van Leeuwenhoek**, v. 94, p. 463, 2008.

Garmendia, J. L.; Viedma, P.I.; Arza, J. M. Onicomycosis: diagnóstico y tratamiento. **Inf. Ter. Sist. Nac. Salud**, v. 32, p. 83, 2008.

Gupta, A.K.; Tu, L.Q. Therapies for onychomycosis: a review. **Dermatol. Clin.**, v. 24, p. 375, 2006.

Gupta, A.K.; Kohli, Y. *In vitro* susceptibility testing of ciclopirox, terbinafine, ketoconazole and itraconazole against dermatophytes and nondermatophytes, and *in vitro* evaluation of combination antifungal activity. **British J. Dermatol.**, v. 149, p. 296, 2003. b

Gurgel, L.A.; Sidrim, J.J.C.; Martins, D.T.; Cechinel-Filho, V.; Rao, V.S. *In vitro* antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. **J. Ethnopharmacol.**, v. 97, p. 409, 2005.

Han, Y. Synergic effect of grape seed extract with amphotericin B against disseminated candidiasis due to *Candida albicans*. **Phytomed.**, v. 14, p. 733, 2007.

Harvey, A. L. Natural products in drug discovery. Review. **Drug Discov. Today**, V. 13, p. 19, 2008.

Johnson, R. A. HIV disease: mucocutaneous fungal infections in HIV disease. **Clin. Dermatol.**, v. 18, p. 411, 2000.

Kobayashi, T.; Kakeya, H.; Miyazaki, T.; Izumikawa, K.; Yanagihara, K.; Ohno, H.; Yamamoto, Y.; Tashiro, T.; Kohno, S. Synergistic antifungal effect of lactoferrin with azole antifungals against *Candida albicans* and a proposal for a new treatment method for invasive candidiasis. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 64, p. 292, 2011.

Kubo, I.; Xião, P.; Nihei, K.; Fugita, K.; Yamagiwa, Y.; Kamikawa, T. Molecular Design of Antifungal Agents. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 3992, 2002.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680, 1970.

Leal, P. C.; Mascarello, A.; Derita, M.; Zuljan, F.; Nunes, R. J.; Zacchino, S.; Yunes, R. A. Relation between lipophilicity of alkyl gallates and antifungal activity against yeasts and filamentous fungi. **Bioorg. Med Chem. Lett.**, v. 19, p. 1793, 2009.

- Leite, F.S. “Perfil fenotípico e de expressão de proteínas de *Cryptococcus neoformans* após tratamento com substâncias obtidas da planta *Pterogyne nitens*”. 2010. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP- Araraquara.
- Leng, W.; Liu, T.; Li, R.; Yang, J.; Wei, C.; Zhang, W.; Jin, Q. Proteomic profile of dormant *Trichophyton rubrum* conidia. **BMC Genomics**, v. 9, p. 303, 2008.
- Li, H.; Lu, Q.; Wan, Z.; Zhang, J. *In vitro* combined activity of amphotericin B, caspofungin and voriconazole against clinical isolates of *Trichosporon asahii*. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v.6, p. 550, 2010.
- Macêdo, D. P.C.; Neves, R. P.; Magalhães, O. M. C.; Souza- Motta, C. M.; Queiroz, L.A. Pathogenic aspects of *Epidermophyton floccosum* Langeron et Milochevich as a possible a ethiological agent of tinea capitis. **Braz. J. Microbiol.**, v. 36, p. 6, 2005.
- Maranhão, F.C.A.; Paiao, F.G.; Fachin, A.L.; Martinez-Rossi N.M. Membrane transporter proteins are involved in *Trichophyton rubrum* pathogenesis. **J. Med. Microbiol.**, v. 58, p. 163, 2009.
- Martinez-Rossi, N.; Peres, N. T. A.; Rossi, A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathol.**, v. 166, p. 369, 2008.
- Matasyoh, J.C.; Maiyo, Z.C.; Ngure, R.M. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Coriandrum sativum*. **Food. Chem.**, v. 113, p. 526, 2008.
- Monod, M. Secreted Proteases from Dermatophytes. **Mycopathol.**, v. 166, p. 285, 2008.
- Morais, M.C.; Luqman, S.; Kondratyuk, T.P.; Petronio, M.S.; Regasini, L.O.; Silva, D.H.; Bolzani, V.S.; Soares, C.P.; Pezzuto, J.M. Suppression of TNF- α induced NF κ B activity by gallic acid and its semi-synthetic esters: possible role in cancer chemoprevention. **Nat. Prod. Res.**, v. 24, p. 1758, 2010.
- Mossman, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Meth.**, v. 65, p. 55, 1983.
- Mukherjee, P.K.; Leidich, S. D.; Isham, N.; Leitner, I.; Ryder, N. S.; Ghannoum, M. A. Clinical *Trichophyton rubrum* Strain Exhibiting Primary Resistance to Terbinafine. **Antim. Agents Chemother.**, v. 47, p. 82, 2003.

Neuhoff, V.; Arold, N.; Taube, D.; Ehrhardt, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophor.**, v. 9, p. 255, 1988.

Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural products as sources of drugs over the last 25 years. **J. Nat. Prod.**, v.70, p. 461, 2007.

Nihei, K.; Nihei, A.; Kubo, I. Molecular Design of Multifunctional Food Additives: Antioxidative Antifungal Agents. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 5011, 2004

Nussbaum, V.F.; Brands, M.; Hinzen, B.; Weigand, S.; Habich, D. Antibacterial natural products in medicinal chemistry-exodus or revival? **Angew. Chem.**, v. 45, p. 5072, 2006.

Odds, F. C. Antifungal agents: their diversity and increasing sophistication. **Mycologist.**, v. 2, p. 51, 2003.

Osborne CS, Leitner I, Hofbauer B, Fielding CA, Favre B, Ryder NS. Biological, biochemical, and molecular characterization of a new clinical *Trichophyton rubrum* isolate resistant toterbinafine. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, p. 2234, 2006.

Pappalardo, M. C. S. M.; Melhem, M. S. C. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 45, p. 299, 2003.

Pendrak, M.L.; Krutzsh, H.C.; Roberts, D.D. Structural requirements for the hemoglobin to induce fibronectin receptor expression in *Candida albicans*. **Biochem.**, v. 39, p. 16110, 2000.

Pereira, D.B.; Meireles, M.C.A. Doenças causadas por fungos e oomycetos. In: Riet-Correa,F. et al. Doenças de ruminantes e eqüinos. 2001. Cap. 4, p.367.

Peres, N.T.; Maranhão, F.C.; Rossi, A.; Martinez-Rossi, N.M. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. **An. Bras. Dermatol.**, v. 5, p. 657, 2010.

Pfaller, M.A.; Sutton, D.A. Review of in vitro activity of sertaconazole nitrate in the treatment of superficial fungal infections. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis**, v. 56, p. 147, 2006.

Purim, K.S.; De Freitas, C.F.; Leite, N. Feet dermatophytosis in soccer players. **Bras. Dermatol.**, v.5, p. 550, 2009.

Reis, B.; Martins, M.; Barreto, B.; Milhazes, N.; Garrido, M.; Silva, P.; Silva, P.; Garrido, J.; Borges, F. Structure-Property-Activity Relationship of Phenolic Acids and Derivatives. Protocatechuic Acid Alkyl Esters. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, p. 6986, 2010.

Rezende, C.; Borsari, G. P.; Silva, A. C. F.; Cavalcanti, F. R. Estudo epidemiológico das dermatofitoses em instituições públicas da cidade de Barretos, São Paulo, Brasil. **Rev. Br. Anal. Clin.**, v. 40, p.13, 2008.

Rifai, N.; Gillette, M.A.; CARR, S.A. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. **Nat. Biotechnol.**, v. 8, p. 971, 2006.

Rivas-Galindo VM. Screening of antifungal activity of plants from the northeast of Mexico. **J. Ethnopharmacol.**, v.114, p. 468, 2007.

Rocha, E.M.F.; Gardiner, R.E.; Park, S.; Martinez-Rossi, N.M.; Perlin, D.S. A phe389Leu substitution in ErgA confers terbinafine resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, p. 2533, 2006.

Rojas, J. J.; Ochoa, V. J.; Ocampo, S. A.; Muñoz, J. F. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. **BMC Compl. Alternative Med.**, v. 6, p. 2, 2006.

Ruiz, L. R. B.; Zaitz, C. Dermatophytes and dermatophytosis in the city of São Paulo, from August 1996 to July 1998. **An. Bras. Dermatol.**, v. 4, p. 391, 2001.

Sabadin, C.S.; Benvegnú, S.A.; Fontoura, M.M.; Saggin, L.M.; Tomimori, J.; Fischman O. Onychomycosis and tinea pedis in athletes from the State of Rio Grande Do Sul (Brazil): a cross-sectional study. **Mycopathol.**, v. 3, p. 183, 2011.

Scorzoni, L. “Estudo da atividade antifúngica e perfil de expressão de proteínas em leveduras do gênero *Candida* após tratamento com extratos de *Kielmeyera rubriflora*”. 2008. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP-Araraquara.

Seebacher, C.; Bouchara, J.P.; Mignon, B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. **Mycopathol.**, v. 166, p. 335, 2008.

Seipelt, J.; Liebig, H. D.; Sommergruber, W.; Gerner, C.; Kuechler, E. 2a proteinase of human rhinovirus cleaves cytokeratin 8 in infected HeLa cells. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 20084, 2000.

Shirwaikar, A. A.; Thomas, T.; Shirwaikar, A.; Lobo, R.; Prabhu, K. S. Treatment of onychomycosis: an update. **Indian. J. Pharm.**, v.70, p. 710, (2008).

Sidrim, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Micologia Medica a luz de autores contemporâneos*. 2004. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.388.

Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosman, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. *Farmacognosia: Da planta ao medicamento*. 3. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFSC/Editora da UFSC, 2001.

Simonnet C.; Berger, F.; Gantier, J.C. Epidemiology of superficial fungal diseases in French Guiana: a three-year retrospective analysis. **Med Mycol.**, v. 49, p. 608, 2011.

Simpanya, M. F. Dermatophytes: Their taxonomy, ecology and pathogenicity. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 699, p. 1, 2000.

Siqueira, E. R.; Ferreira, J. C.; Maffei, C. M. L.; Candido, R. C. Occurrence of dermatophyte, in nails, feet and hands of university students. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 3, p. 269, 2006.

Sleno L.; Emili A. Proteomic methods for drug target discovery. **Cur. Opin. Chem. Biol.**, v. 12, p.46, 2008.

Smith, M.P.; Banks, R.E.; Wood, S.L.; Lewington, A.J.; Selby, P.J. Application of proteomic analysis to the study of renal diseases. **Nat. Rev. Nephrol.** V. 12, p. 701, 2009.

Soares, E. S. Ácidos fenólicos como antioxidantes. Revisão. **Rev. Nutr.**, Campinas, v.1, p. 71, 2002.

Spitzer, M.; Griffiths, E.; Blakely, K. M.; Wildenhain, J.; Ejim, L.; Rossi, L.; De Pascale, G.; Curak, J.; Brown, E.; Tyers, M.; Wright, G. D. Cross-species discovery of syncretic drug combinations that potentiate the antifungal fluconazole. **Molecular Systems Biology**, v. 7, p. 1, 2011.

Stoppa, M. A.; Casemiro, L. A.; Vinholis, A. H. C.; Cunha, W. R.; Andrade, M. L. S.; Martins, C. H. G. Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. **Química Nova.**, v. 32, p. 498, 2009.

Studier, F.W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. **J. Mol. Biol.**, v. 79, p. 237, 1973.

Sugita, T., Y.; Shiraki, Hiruma, M.. Genotype analysis of the variable internal repeat region in the rRNA gene of *Trichophyton tonsurans* isolated from Japanese Judo practitioners. **Microbiol. Immunol.** v. 50, p. 57, 2006.

Tallarida, R.J. Drug Synergism: Its Detection and Applications. **J. Pharmacol. Experim. Therap.**, v. 298, p. 3, 2001.

Tosti, A., B. M.; Piraccini; Stinchi, C.; Colombo, M.D. Relapses of onychomycosis after successful treatment with systemic antifungals: a threeyear follow-up. **Dermatol.**, v. 197, p. 162, 1998.

Vazquez JA. Combination antifungal therapy: the new frontier. Review. **Future Microbiol.**, v. 2, p. 115, 2007.

Weeks, J.; Moser, S.A.; Elewski, B. E. Superficial cutaneous fungal infections. Dismukes, WE, Pappas, PG, Sobel, JD, eds. **Clinical Mycology.**, p. 370, 2003.

Wei GX, Xu X, Wu CD. In vitro synergism between berberine and miconazole against planktonic and biofilm *Candida* cultures. **Arch. Oral Biol.**, v. 6, p. 565-72, 2011.

Weitzman, I.; Summerbell, R.C. The Dermatophytes. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 8, p. 240, 1995.

Welsh, O.; Welsh, E.; Ocampo-Candiani, J.; Gomez, M.; Vera-Cabrera, L. Dermatophytoses in Monterrey, México. **Mycoses**, v. 49, p. 119, 2006

Westermeier, R.; Marouga, R. Protein detection methods in proteomics. **Biosci. Rep.**, v. 25, 2005.

White, T.C.; Oliver, B.G.; Gräser, Y.; Henn, M.R. Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes. Review. **Eukaryot. Cell.**, v. 8, p. 1238, 2008.

Wilkins, M.R.; Pasquali, C. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Biotechnol.**, v. 14, p. 61, 1996.

Wojtaszek, K.P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. **Biochem. J.**, v. 322, p. 681, 1997.

Ximenes VF, Lopes MG, Petrônio MS, Regasini LO, Silva DH, da Fonseca LM. Inhibitory effect of gallic acid and its esters on 2,2'-azobis(2-amidinopropane)hydrochloride (AAPH)-induced hemolysis and depletion of intracellular glutathione in erythrocytes. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, p. 5355, 2010.

Yamada, R.; Horikawa, K.; Ishihara, S.; Hoshino, K.; Kawaguchi, T.; Iyama, K.; Mitsuya, H.; Asou, N. Successful treatment of *Aspergillus* liver abscesses in a patient with acute monoclonal leukemia using combination antifungal therapy including micafungin as a key drug. **Int. J. Hematol.**, v. 4, p. 711, 2010.

Yunes, R. A.; Calixto, J. B. Plantas medicinais sob a óptica da química medicinal moderna. Chapecó: Argos, 2001.

Zhu, L. L.; Gil-Lamagnere, C.; Muller, F. Effects of several antifungal drug combinations against clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* from China. **Mycoses**, v. 47, p. 319, 2004.

Zomorodian, K.; Uthman, U.; Tarazooie, B.; Rezaie, S. The effect of griseofulvin on the gene regulation of beta-tubulin in the dermatophyte pathogen *Trichophyton rubrum*. **J Infect. Chemother.**, v. 13, p. 373, 2007.