UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Taiza Maschio de Lima

Compostos derivados de chalconas: atividade antifúngica frente a fungos dermatófitos e leveduras do gênero *Candida*

São José do Rio Preto
2024

Taiza Maschio de Lima

Compostos derivados de Chalconas: atividade antifúngica frente a fungos dermatófitos e leveduras do gênero *Candida*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação de Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES - Código de Financiamento 001, n. de processo 88887.487540/2020-00.

Orientador: Profa. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida.

São José do Rio Preto
2024

L732c

Lima, Taiza Maschio de

Compostos derivados de chalconas: atividade antifúngica frente a fungos dermatófitos e leveduras do gênero Candida / Taiza Maschio de Lima. -- São José do Rio Preto, 2024

84 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Margarete Teresa Gottardo de Almeida

1. Micoses. 2. Agentes Antifúngicos. 3. Dermatófitos. 4. Candidas. 5. Chalconas. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Taiza Maschio de Lima

Compostos derivados de Chalconas: atividade antifúngica frente a fungos dermatófitos e leveduras do gênero *Candida*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação de Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES - Código de Financiamento 001, n. de processo 88887.487540/2020-00.

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientadora

Profa. Dra. Maria Lúcia Scroferneker
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Catia Rezende
Centro Universitário de Votuporanga - UNIFEV

Profa. Dra. Mariela Domiciano Ribeiro Marques
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP

Profa. Dra. Márcia Maria Costa Nunes Soares
Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
26 de fevereiro de 2024

Dedico,
Aos meus pais Sueli e José.
As pessoas especiais da minha vida.
Enfim, aqueles que apoiaram e acreditaram
neste projeto tão importante para mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida e por todas as graças e bênçãos concedidas, que muitas vezes vieram na forma de pessoas que se tornaram amigos e inspirações.

À minha orientadora e total luz da minha vida profissional, a querida Profa. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida pela oportunidade e também por toda sua generosidade, colaboração, força, incentivo e ensinamentos, além de contribuir no aumento do meu fascínio pela microbiologia e pela pesquisa científica. Muito obrigada professora por me proporcionar a oportunidade de realizar o mestrado e doutorado, e por orientar em todos os sentidos, além de me incluir na sua família.

Especialmente, agradeço aos meus pais, Sueli e José, ao meu irmão Tiago que são a minha base e sempre me incentivaram a estudar, a lutar pelos meus sonhos e a ser uma pessoa de caráter. Ao meu noivo Fernando, por me trazer conforto, calmaria, afeto, esperança e apoio, principalmente nos momentos de angústias e dúvidas, e também por sempre me lembrar do meu potencial.

Para os demais agradecimentos, retorno ao início da minha trajetória profissional… a graduação, na qual descobri o meu fascínio pelo fantástico mundo da microbiologia, e por meio de excelentes professores, em especial minha orientadora Profa. Dra. Fádua Rits, despertou em mim um intenso interesse pela pesquisa científica e pela docência. Assim, a conquista do título de doutor é mais do que um objetivo de vida, é um sonho idealizado há 10 anos e que agora será concretizado.

Desta forma, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação profissional e pessoal, que consequentemente, me trouxeram aqui para a realização deste objetivo tão almejado. Na qual destaco todos os profissionais do Instituto Adolfo Lutz, onde realizei o Aprimoramento Profissional em Microbiologia em 2015, em especial minha orientadora Dra. Heloísa Paro. Aos professores do curso de pós-graduação lato sensu em Análises Clínicas da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (turma de 2016). Assim como, todos os profissionais, amigos e colegas que convivi durante os dois anos de Residência Multiprofissional de Vigilância em Saúde da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (turma 2016-2018), em especial minha co-orientadora Iara Lúcia Lima Machado.

A todos os meus amigos e companheiros do laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto que estiveram presentes em toda

trajetória, desde o mestrado, e que foram fundamentais cedendo-me um pouco de seus vastos e sábios conhecimentos, bem como por toda a ajuda técnica e, principalmente pelo apoio emocional. Assim, agradeço imensamente vocês Mariela, Thiago, Luceli, Emília, Bianca, Zen, Letícia, Isabelle, Profa. Elza, Profa Cléo e Profa Margarete, saibam que sempre estarão em meu coração e em minhas orações.

Ao professor Dr. João Paulo Zen Siqueira e Dra Márcia Maria Costa Nunes por participarem da banca examinadora de qualificação, contribuindo com a melhoria desta pesquisa, bem como, a banca examinadora da defesa: Profa. Dra. Maria Lucia Scroferneker, Dra. Mariela Domiciano Ribeiro Marques, Profa. Dra. Cátia Rezende, Dra. Márcia Maria Costa Nunes, Profa. Dra. Elza Maria Castilho e Dr. Thiago Henrique Lemes.

Ao laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, em especial ao Prof. Dr. Octávio Regasini e seus alunos Paulo Tarso e Julyanna Andrade.

Ao laboratório de Microbiologia e a Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto pela infraestrutura de ensino e pesquisa, essenciais para a realização desta pesquisa.

Ao programa de pós-graduação em Microbiologia, professores, coordenadores e equipe técnica da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, pela disponibilidade, ensinamentos, aprendizados e toda dedicação direcionada aos alunos de pós-graduação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, n. de processo 88887.487540/2020-00, à qual agradeço.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar, p. 21, 1893.

RESUMO

As dermatomicoses ocorrem quando os fungos, em especial os dermatófitos, invadem toda a espessura da capa córnea da pele, parte queratinizada intrafolicular dos pelos ou a lâmina ungueal. O escasso arsenal antifúngico utilizado para o tratamento e a mudança no perfil de suscetibilidade dos agentes etiológicos têm contribuído para a perpetuação dessas micoses na população. Em tal conjuntura, a busca por novas substâncias antimicrobianas tem ganhado importância. Nesta área, temos em destaque as chalconas, precursores da família dos flavonoides, pelo amplo espectro de ações biológicas, incluindo a antimicrobiana. O presente estudo apresenta como objetivo avaliar a atividade antifúngica de compostos derivados de chalconas contra linhagens de fungos dermatófitos (*Trichophyton rubrum, T. mentagrophytes*, *Microsporum canis* e *Epidermophyton floccosum*) e leveduras do gênero *Candida* (*C. albicans, C. parapsilosis, C. glabrata* e *C. auris*). A ação antifúngica foi testada por ensaios de microdiluição, de acordo com o protocolo descrito no documento M38- 3rd e M27- 4rd do *Clinical Laboratory Standard Institute,* para determinar a concentração inibitória mínima e a concentração fungicida mínima. As cepas também foram analisadas por microdiluição para determinar o perfil de suscetibilidade aos antifúngicos convencionais fluconazol, itraconazol, terbinafina e griseofulvina. O efeito combinatório entre o composto derivado de chalcona e os fármacos convencionais foi analisada pelo método de *Checkerboard* determinando se há ação sinérgica, aditiva, indiferente ou antagônica. Para a investigação do alvo de ação dos compostos na célula fúngica, especialmente parede celular e membrana celular, foram realizados ensaios com sorbitol e ergosterol. Ensaio da cinética de morte pelo método de Time kill também foi realizado, assim como, a avaliação de toxicidade, *in vivo*, com *Galleria mellonella*. O composto derivado de chalcona VS02 - 4'etil obteve melhor atividade antifúngica com valores de concentração inibitória mínima entre 7,81 µg/mL e 31,25 µg/mL contra dermatófitos, e 500 µg/mL e >1.000 µg/mL frente as leveduras. O efeito combinatório entre o composto VS02 - 4'etil e antifúngicos convencionais demonstrou sinergia, ocorrendo importante diminuição da concentração inibitória mínima para valores entre 0,12 µg/mL e 250 µg/mL. Através do ensaio de sorbitol e ergosterol observou-se que a membrana celular fúngica é a estrutura alvo de ação do composto. Na cinética de morte microbiana, melhor a atividade do composto foi contra a cepa *M. canis* na concentração de 500 µg/mL, na qual houve 100% de inibição fúngica após 24h. No ensaio de toxicidade *in vivo*, não foi observada toxicidade nas doses de 125 mg/kg e 250 mg/kg, na qual 60% das larvas sobreviveram até o dia 5. A ação antifúngica das chalconas e seus derivados já foi relatada por diversos estudos e inspirado por estes resultados, a presente pesquisa conduziu essa avaliação contra fungos causadores de dermatomicoses, observando um promissor efeito combinatório aos antifúngicos convencionais, visto que a ação sinérgica das chalconas com os medicamentos atuais ainda é restrito, sobretudo para fungos dermatófitos.

Palavras–chave: Micoses. Onicomicose. Dermatófitos. Candidas. Agentes Antifúngicos. Chalconas.

ABSTRACT

Cutaneous mycoses occur when fungi, especially dermatophytes, invade the entire thickness of the horny layer of the skin, the intrafollicular keratinized part of the hairs or the nail plate. The scarce antifungal arsenal used for the treatment and the change in the susceptibility profile of the etiological agents have contributed to the perpetuation of these mycoses in the population. In such a situation, the search for new antimicrobial substances has gained importance. In this area, we highlight chalcones, precursors of the flavonoid family, due to their broad spectrum of biological actions, including antimicrobial. The present study aims to evaluate the antifungal activity of compounds derived from chalcones against dermatophyte fungal strains (*Trichophyton rubrum, T. mentagrophytes, Microsporum canis* and *Epidermophyton floccosum*) and yeasts of the genus Candida (*C. albicans, C. parapsilosis, C. glabrata* and *C. auris*). The antifungal action was tested through microdilution assays, according to the protocol described in the Clinical Laboratory Standard Institute document M38-3rd and M27-4rd, to determine the minimum inhibitory concentration and the minimum fungicidal concentration. The strains were also analyzed by microdilution to determine the susceptibility profile to the conventional antifungals fluconazole, itraconazole, terbinafine and griseofulvin. The combinatorial effect between compound derived from chalcone and conventional drugs was analyzed by the Checkerboard method, determining whether there is a synergistic, additive, indifferent or antagonistic action. To investigate the target of action of the compounds in the fungal cell, especially the cell wall and cell membrane, assays were carried out with sorbitol and ergosterol. Assay of kinetics of death by the Time kill method was also carried out, as well as the evaluation of toxicity, in vivo, with *Galleria mellonella*. The compound derived from chalcone VS02 - 4'ethyl obtained better antifungal activity with minimum inhibitory concentration values between 7.81 µg/mL and 31.25 µg/mL against dermatophytes, and 500 µg/mL and >1,000 µg/mL against the yeasts. The combinatorial effect between the compound VS02 - 4'ethyl and conventional antifungals showed synergy, with a significant decrease in the minimum inhibitory concentration to values between 0.12 µg/mL and 250 µg/mL. Through the sorbitol and ergosterol assay, it was observed that the fungal cell membrane is the target structure of the compound's action. In the kinetics of microbial death, the best activity of the compound was against the *M. canis* strain at a concentration of 500 µg/mL, in which there was 100% fungal inhibition after 24h. The in vivo toxicity test, toxicity was not observed at doses of 125 mg/kg and 250 mg/kg, 60% of larvae survived until day 5. From these results, there is potential for the use of chalcone-derived compounds as new therapeutic perspectives, especially in infections caused by dermatophytes.

Keywords: Mycoses. Onychomycosis. Dermatophytes. Candidas. Antifungal Agents. Chalcones.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Apresentação clínica das tineas. **16**

Figura 2 - Apresentação clínica das onicomicoses. **17**

Figura 3 - Distribuição dos agentes dermatófitos nas regiões brasileiras. **22**

Figura 4 - Culturas em ágar Sabouraud das principais espécies de dermatófitos. **24**

Figura 5 - Processo da infecção por dermatófitos na pele. **27**

Figura 6 - Estrutura química das chalconas. **32**

Figura 7 - Estrutura química dos compostos derivados de chalconas. **39**

Figura 8 - Layout do ensaio *Checkerboard* para avaliação do efeito combinatório do composto com os fármacos fluconazol, itraconazol. griseofulvina e terbinafina. **42**

Figura 9 - Layout do ensaio de ergosterol e sorbitol para avaliação da ação do composto na membrana citoplasmática e parede celular fúngica **44**

Figure 1 - Chemical structure of the chalcone-derived compound VS02–4'ethyl. **51**

Figure 2 - Time-kill kinetics assay. Log10 CFU/ml after 0, 8, 24, 48, and 120 hours. **57**

Figure 3 - Survival rate (%) of *Galleria mellonella* larvae exposed to different concentrations of the VS02–4'ethyl chalcone-derived compound, and distilled water, 60% DMSO, 99.9% ethanol. **58**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Isolados de dermatófitos e *Candida* utilizados, segundo código de identificação e origem da cepa. **37**

Tabela 2 - Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) dos compostos derivados de chalconas testados contra *T. rubrum* e *T. mentagrophytes.* **47**

Tabela 3 - Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) dos compostos derivados de chalconas testados contra as leveduras *C. albicans, C. parapsilosis, C. glabrata* e *C. auris.* **48**

Table 1 - Dermatophytes and *Candida* isolates included in this study, the identification code, culture collection and origin of isolation **50**

Table 2 - Minimum inhibitory concentrations (MIC), minimum fungicidal concentrations (MFC), and geometric mean MIC values of the chalcone-derived compound; and MIC values of fluconazole, itraconazole, terbinafine, and griseofulvin, against the isolates of *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis*, *E. floccosum*, *C. glabrata*, and *C. auris* included in this study. **55**

Table 3 - Sorbitol and ergosterol supplementation tests. Minimum inhibitory concentration (MIC) values (in µg/ml) of the VS02–4'ethyl chalcone-derived compound, caspofungin, and amphotericin B, before and after medium supplementation with sorbitol or ergosterol, against *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis*, *E. floccosum*, *C. glabrata*, and C. *auris* isolates. **56**

Table 4 - Checkerboard assays results. Minimum inhibitory concentration (MIC) values (in µg/ml) of the VS02–4'ethyl chalcone-derived compound and fluconazole, itraconazole, griseofulvin, and terbinafine, alone and combined, against *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *C. glabrata*, and *C. auris* isolates; and fractional inhibitory concentration index (FICI), which indicates the nature of the combinatory effect of the compounds. **59**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABD	Agar Batata Dextrose
ASD	Agar Sabouraud Dextrose
ATCC	*American Type Culture Colection*
CBS	*Centraalbureau voor Schimmelcultures*
CEM	Concentração Efetiva Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	*Clinical Laboratory Standard Institute*
CSD	Caldo Sabouraud Dextrose
DMSO	Dimetil sufóxido
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionada
KOH	Hidróxido de potássio
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RPMI	*Rosen Park Memorial Institute*
ODT	Distrófica Total
OSDL	Subungueal Distal e Lateral
OSB	Superficial Branca
OSP	Subungueal Proximal
UFC	Unidade Formadora de Colônia

LISTA DE SÍMBOLOS

M	Molar
mL	Mililitro
mg	Miligrama
mm	Milímetro
nm	Nanômetro
PM	Peso molecular
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micrometro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 20
2.1 Epidemiologia 20
2.2 Fungos dermatófitos 23
2.3 Leveduras do gênero *Candida* 27
2. 4 Diagnóstico laboratorial das dermatomicoses 29
2. 5 Tratamento das dermatomicoses 30
2.6 Compostos derivados de chalconas 31
3 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA 34
4 OBJETIVO 36
4.1 Objetivos específicos 36
5 MATERIAL E MÉTODOS 37
5.1 Linhagens fúngicas 37
5.2 Síntese dos compostos químicos derivados de chalconas 38
5.3 Triagem dos compostos derivados de chalconas através do perfil de suscetibilidade 39
5.4 Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das linhagens de dermatófitos e leveduras frente ao composto derivado de chalcona e aos fármacos fluconazol, itraconazol, griseofulvina e terbinafina 40
5.5 Ensaio *Checkerboard* 41
5.6 Ensaio com sorbitol e ergosterol 43
5.7 Ensaio de cinética de morte - Time kill 44
5.8 Ensaio de toxicidade com *Galleria mellonella* 45
6 RESULTADOS 47
6.1 Triagem dos compostos derivados de chalconas 47
6.2 Artigo original: Synergistic activity between conventional antifungals and chalcone-derived compound against dermatophyte fungi and *Candida* spp. 48
7 CONCLUSÕES 68
REFERÊNCIAS 69

1 INTRODUÇÃO

Certos fungos são capazes de invadir toda a espessura da capa córnea da pele ou a parte queratinizada intrafolicular dos pelos, ou ainda a lâmina ungueal. Em decorrência há lesões que se manifestam na pele como mancha inflamatória, no pelo como lesão de tonsura e na unha com destruição da lâmina ungueal (Lacaz et al., 2022). As infecções fúngicas que se restringem às camadas mais superficiais e queratinizadas da pele e anexos são denominadas de dermatomicoses, e ainda onicomicoses quando há o envolvimento ungueal, sendo ocasionadas primordialmente por dermatófitos e leveduras (Corralo; Heras-Alonso; Acebes, 2014). Neste seguimento, as infecções causadas por fungos dermatófitos, denominadas dermatofitoses, se destacam (Ely; Rosenfeld; Seabury, 2014).

As dermatofitoses são referidas como infecções por “tineas” e recebem derivações nominais de acordo com a área corporal acometida. Na *Tinea corporis* lesões superficiais e inflamatórias ocorrem na pele, apresentando evolução centrífuga, única ou múltipla. Tais lesões possuem coloração rósea, podendo ser pruriginosa e descamativa com pequenas pápulas ou vesículas (Widders; Sagebiel, 2013; Ely; Rosenfeld; Seabury, 2014). A *Tinea cruris* apresenta-se por descamações na pele genital, púbica, perineal e perianal que se expandem para coxas e nádegas, formando lesões eritematosas com bordas delimitadas acompanhadas de intenso prurido (Pippin; Madden; Das, 2022).

A *Tinea pedis* acomete a sola dos pés e os espaços interdigitais, sendo a forma mais prevalente de infecção por dermatófitos na idade adulta (Kelly, 2012). A doença interdigital é a forma mais comum de *Tinea pedis* e pode ser uma condição crônica, na qual frequentemente há fissuras, descamação e maceração das áreas interdigitais ou subdigitais, particularmente a membrana dos dedos e há um acúmulo esbranquiçado de escamas com erosões vermelhas (Gupta et al., 2003). Em contrapartida, a *Tinea capitis* é a micose que atinge principalmente crianças, sendo rara nos adultos, ocorre no couro cabeludo e nos cabelos provocando descamação e alopecia em placas (Gupta; Friedlander; Simkovich, 2022).

A *Tinea barbae* é pouco frequente e de difícil diagnóstico, a forma inflamatória clássica desenvolve uma lesão característica chamada kerion, caracterizada por nódulo ou placa eritematosa, sensível e muitas vezes com pústulas, podendo ocorrer nas regiões preauricular e submentoniana ao afetar a pele e os folículos pilosos da

barba e bigode (Kuruvella; Pandey, 2022). Ainda há a *Tinea manum* caracterizada pelo aparecimento de lesões, de aspecto desidrótico ao hiperqueratótico na palma da mão e na parte lateral dos dedos, ou ainda placa vermelha com uma borda vesicular e escamosa ativa com crescimento centrífugo (Sidrim; Rocha, 2010; Chamorro; House, 2022).

Figura 1. Apresentação clínica das tineas.

Na *Tinea ungueum,* normalmente denominada como onicomicose, a infecção fúngica ocorre nas unhas, e se caracteriza clinicamente por descolamento, descoloração, hiperqueratose e onicólise do leito ungueal, sendo de difícil cura e alta taxa de recorrência (Achterman; White, 2013; Leung et al., 2019). Pode afetar todos os grupos populacionais, sobretudo os idosos, na qual a incidência é superior a 40%, fato relacionado à imunidade baixa e às doenças vasculares periféricas ou metabólicas. Além do mais, fatores de suscetibilidade relacionado ao hospedeiro estão diretamente associados ao estilo de vida, ocupação, sexo e doenças crônicas (Leung et al., 2019; Bodman, Krishnamurthy, 2022).

Devido às diferentes formas clínicas de manifestação, as onicomicoses são classificadas em: Subungueal Distal e Lateral (OSDL); Subungueal Proximal (OSP); Superficial Branca (OSB) e Distrófica Total (ODT) (Piraccini; Alessandrini, 2015),

conforme figura 2. Para essa classificação são considerados critérios como localização, extensão do comprometimento e coloração das unhas (Lipner; Scher, 2019).

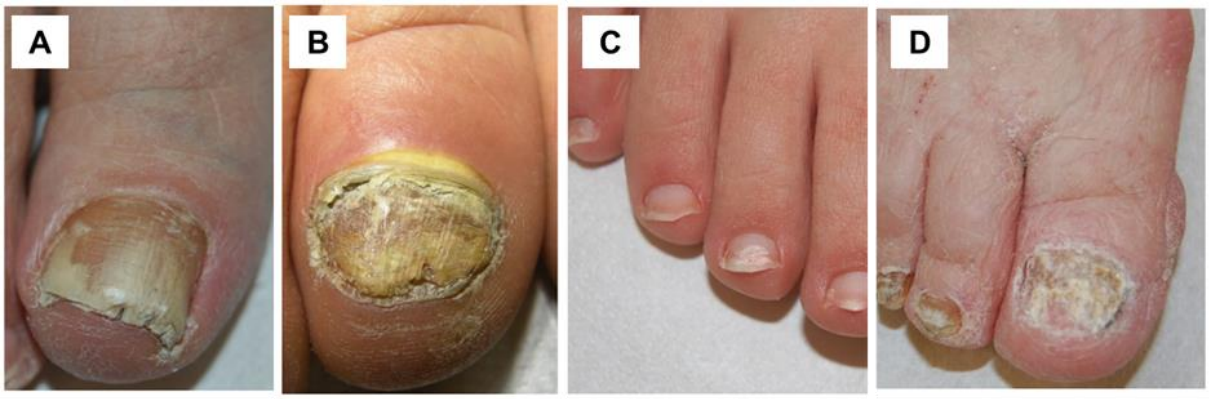

Figura 2: Apresentações clínicas das onicomicoses: (A) descoloração, onicólise e hiperceratose subungueal causada por OSDL; (B) OSP causando descoloração da placa ungueal proximal; (C) manchas opacas brancas da placa ungueal, caracterizando OSB e (D) ODT com placa ungueal quebradiça e totalmente invadida por fungo. Fonte: Piraccini; Alessandrini, 2015.

As micoses superficiais cutâneas são extremamente comuns, mas fatores como localização geográfica, condições climáticas, estilo de vida ou doenças crônicas do hospedeiro influenciam as taxas de incidência (Sigurgeirsson; Baran, 2014; Beuscher; Kelechi, 2019). São raramente fatais, no entanto, são frequentemente recorrentes e crônicas, podendo resultar em morbidade, desconforto, desfiguramento, isolamento social e predispor a infecções secundárias (Brown et al., 2012; El-gohary et al., 2014).

Os maiores causadores dessas micoses são os dermatófitos, grupo de fungos filamentosos hialinos que produzem enzimas que digerem a queratina, utilizando-a como fonte nutricional, fornecendo maior capacidade de infectar tecidos queratinizados. Assim, esses agentes afetam o estrato córneo, cabelos e unhas, ocasionando as infecções denominadas dermatofitoses (Sidrim; Rocha, 2010; Begum et al., 2020).

Embora os dermatófitos tendem a poupar as estruturas cutâneas mais profundas devido a preferência por áreas mais queratinizadas, em indivíduos com déficits no sistema de defesa a infecção pode se estender para camadas mais profundas. A infecção por *Trichophyton rubrum* e *Microsporum canis* no folículo piloso,

por exemplo, pode ocasionar granuloma de Majocchi com formação de múltiplas pústulas eritematosas, pápulas ou nódulos (Ilyas; Sharma, 2017).

Os dermatófitos são predominantemente adquiridos pelo contato direto com humanos e animais infectados, mas também, através de fômites como solo, aparas de unhas dos pés, roupas de cama, assentos sanitários, chuveiros, piscinas e vestiários (Murmu et al., 2015; Allizond et al., 2016). Tanto as crianças como os adultos podem ser portadores assintomáticos, atuando como reservatórios dos fungos e fonte de transmissão. Além disso, objetos como sapatos, meias, chapéus, pentes, almofadas e lençóis podem ser meios externos para a sobrevivência dos fungos por longos períodos (Hernandez et al., 2004).

A dermatofitose além de ser uma dificuldade cosmética também é considerada um importante problema de saúde pública e econômico, ao impactar na qualidade de vida das pessoas (Ayanlowo; Oladele, 2014). Nas últimas duas décadas, houve um aumento na incidência da doença nos humanos, relacionado aos problemas socioeconômicos, viagens internacionais em grande escala, imigração de países tropicais, condições climáticas e contato com animais, sobretudo animais de estimação (Gordon et al., 2016; Gupta et al., 2017). Além do mais, o aumento da idade e o uso de drogas imunossupressoras são fatores predisponentes para uma morbidade induzida (Gordon et al., 2016).

Outra micose de importância clínica é a candidíase causada por leveduras do gênero *Candida*, em especial a espécie *Candida albicans*. Esses fungos leveduriformes normalmente fazem parte da microbiota humana, habitando o trato gastrintestinal e regiões do tegumento cutâneo. Contudo, a *Candida* pode invadir a camada córnea da pele ou a lâmina ungueal, tanto de indivíduos imunocomprometidos como de imunocompetentes. Assim, as candidíases se apresentam desde manifestações banais, como a colonização de mucosas, até quadros sistêmicos (Sidrim, Rocha, 2010; McCarty; White; Pappas, 2021).

O correto diagnóstico das micoses é essencial para o sucesso terapêutico, sendo este realizado por exames clínicos e laboratoriais. A análise laboratorial inclui a microscopia e a cultura, que respectivamente revelam a presença de estruturas fúngicas e possibilitam a identificação da espécie (Lim et al., 2021). Essas técnicas combinadas com uma ampla gama de ferramentas recém-desenvolvidas, como métodos moleculares, possibilitam o diagnóstico com maior sensibilidade e especificidade (Beuscher, Kelechi, 2019).

O tratamento das dermatomicoses é composto principalmente por terapia antifúngica oral e tópica. A forma combinada pode ser considerada, na qual os antifúngicos tópicos são usados em combinação com os orais, realizando um tratamento de duas vias administrativas (Monod; Méhul, 2019). A terapia antifúngica oral é considerada o padrão-ouro para crianças e adultos devido ao período mais curto de tratamento e maiores taxas de cura, quando comparada à terapia tópica (Khurana; Sardana; Chowdhary, 2019; Lipner et al., 2021; Gupta et al., 2022). Outros recursos como terapia a laser e fotodinâmica, sobretudo nas onicomicoses, também podem ser utilizados (Morgado et al., 2017; Zhang et al., 2022).

A resistência aos medicamentos é uma séria preocupação, que está relacionada, principalmente, à disponibilidade limitada de antifúngicos e a falha dos pacientes em aderir ao longo tratamento (Andersen; Jemec; Saunte, 2020; Gupta et al., 2021). Assim, o escasso arsenal antifúngico para o tratamento de doenças fúngicas, bem como, as mudanças biológicas sobre suscetibilidade aos fármacos e fatores relacionados ao tratamento incompleto têm constituído um desafio para o controle das micoses (Gupta; Stec, 2019).

Em busca de novos fármacos antimicrobianos, substâncias presentes nas plantas, por exemplo, são cada vez mais alvos de estudos devido às mais diferentes propriedades, sobretudo, a atividade antimicrobiana (Ramos et al., 2016). Neste contexto, as chalconas, precursores da família dos flavonoides, apresentam grande potencial de exploração pela Química Medicinal devido a sua fácil síntese e habilidade de interagir com múltiplos alvos biológicos, além da alta tolerabilidade pelos humanos. Essas substâncias apresentam estrutura simples, na qual o núcleo chalcônico é formado pela união de dois anéis aromáticos, os quais são unidos por uma ponte cetônica α, β-insaturada (Leon-gonzalez et al., 2015).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Epidemiologia

As dermatomicoses, na qual compreendem as dermatofitoses, candidíase e pitiríase versicolor, representam uma das doenças infecciosas mais comuns em todo o mundo, afetando sobretudo as populações mais vulneráveis e sendo causa grave de morbidade crônica. No mundo, essas doenças afetam de 20% a 25% da população, com contínuo aumento de incidência (Araya; Abuye; Negesso, 2021; Khodadadi et al., 2021). Neste cenário destacam-se as onicomicoses, causada por fungos dermatófitos, fungos não dermatófitos e leveduras, na qual afetam de 5 a 20% da população, representando 30% de todas as infecções fúngicas superficiais e 50% das doenças ungueais (Sylla et al., 2019).

Os dermatófitos são a causa mais comum de infecções fúngicas em todo o mundo (Hay et al., 2014). Somente nas onicomicoses, correspondem a 70% dos casos, com destaque para a espécie *T. rubrum*, seguida pelo complexo *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum* e *M. canis* (Monod; Méhul, 2019; Gupta et al., 2020a; Appelt et al., 2021). Na *Tinea pedis* os principais agentes associados são o *T. rubrum* e *Trichophyton interdigitale* (Ilkit; Durdu, 2014); na *Tinea capitis*, infecção predominante em crianças, atualmente, se destacam as espécies *M. canis* e *Trichophyton tonsurans* (Hay, 2017).

Na última década há relatos da distribuição das infecções por dermatófitos em diferentes áreas geográficas como Europa (Colosi et al., 2020; Sacheli et al., 2021), Oriente Médio (Segal et al., 2015; Armon et al., 2020), África (Coulibaly et al., 2018), Ásia (Do et al., 2017) e América do Sul (Silva-Rocha; De Azevedo; Chaves, 2017; Carrascal-Correa; Zuluaga; Gonzales, 2020). Apresentam grande diversidade em relação ao tipo de infecção, por exemplo, em países desenvolvidos têm maior prevalência de infecções nos pés (*Tinea pedis*), enquanto os países em desenvolvimento ocorrem mais a *Tinea capitis* e *Tinea corporis* (Achterman; White, 2013).

Neste contexto destacam-se as infecções por agentes antropofílicos dermatófitos, como o *T. rubrum,* evidenciando o papel do contato humano-humano como fonte de infecção (Segal; Elad, 2021). O fungo *T. rubrum* é considerado o dermatófito mais comum no mundo, com maior incidência na Europa, sendo

responsável por 91% dos casos de dermatofitoses na Alemanha e por 90% na Polônia (Nenoff et al., 2014).

Em um estudo conduzido na Bélgica durante cinco anos, o *T. rubrum* foi a espécie predominante com um aumento significativo em sua frequência de 45,8% em 2012 para 69,4% em 2016 (Sacheli et al., 2021). Embora na maior parte do mundo, o *T. rubrum* seja a espécie predominante, atualmente, está sendo cada vez mais substituído pelo *T. interdigitale,* em certas localizações geográficas, a exemplo da Índia (Singh et al., 2018).

Acerca das onicomicoses, na Europa e na América do Norte, as taxas de ocorrência apresentam variações de 4,3% nos estudos de base populacional e 8,9% nos de base hospitalar. A prevalência em crianças na América do Norte é de aproximadamente 0,4%, enquanto nos idosos pode chegar a 35% (Sigurgeirsson; Baran, 2014). Em uma pesquisa com mais de 96.000 pacientes em 20 países europeus, essa micose foi diagnosticada em 29,6% da população (Tchernev et al., 2012). Nos países ocidentais, as onicomicoses são causadas predominantemente por dermatófitos, com frequência entre 50 e 72%, já as leveduras são responsáveis por até 20% e os fungos filamentosos não dermatófitos por 10% (Gupta et al., 2020b).

No Brasil, dados epidemiológicos mostram maior incidência de infecções causadas por fungo antropofílico *T. rubrum* nas regiões Sul e Sudeste, seguido *por M. canis* e *T. mentagrophytes,* ambos zoofílicos. Contudo, na região Nordeste é observada maior prevalência de *T. tonsurans* (antropofílico) acompanhado de *T. rubrum* e *M. canis* (Petrucelli et al., 2020). Estudos regionais associados à epidemiologia das dermatofitoses têm sido realizados, e uma recente revisão de literatura de casos no Brasil, revelou que o *T. rubrum* é o fungo mais prevalente nas regiões sul, sudeste, nordeste e centro-oeste, representando mais de 40% da distribuição. Nas demais espécies, destaca-se o *T*. *mentagrophytes* nas regiões sul e centro-oeste, *T. tonsurans* na região nordeste e *M. canis* na região sudeste (Figura 3) (Pereira, 2022).

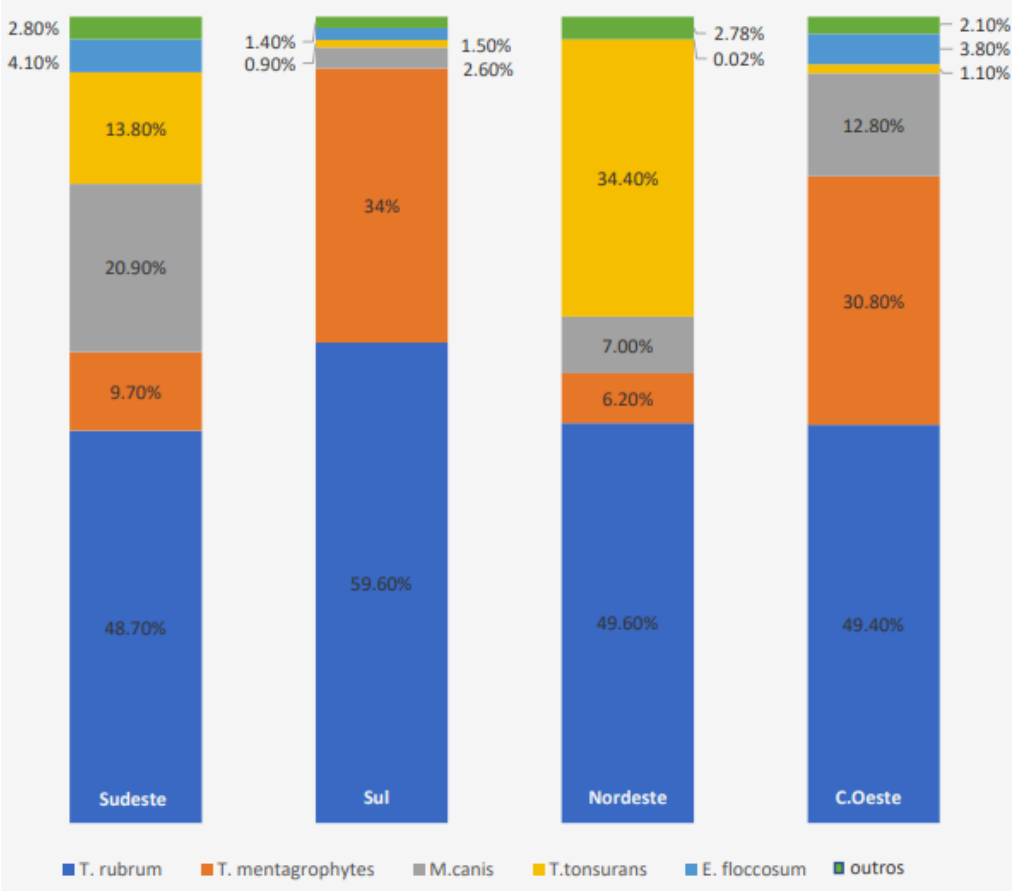

Figura 3. Distribuição dos agentes dermatófitos nas regiões brasileiras. Fonte: Pereira, 2022.

Em relação à conexão entre influências climáticas e a ocorrência de dermatofitoses, ao considerar que os dermatófitos crescem bem em condições úmidas e quentes, a prevalência acaba por ser maior em países localizados em regiões tropicais/subtropicais, com climas úmidos e quentes (Havlickova, Czaika, Friedrich, 2008). A idade também pode desempenhar um papel na prevalência de uma dermatofitose, por exemplo, as onicomicoses são comuns em pacientes mais velhos, principalmente pela associação com comorbidades como diabetes e problemas de circulação sanguínea, enquanto, a *Tinea capitis* é observada com mais frequência em crianças (Lipner; Scher, 2019; Sakkas et al., 2020).

Outro parâmetro a ser considerado é o sexo, havendo discrepâncias entre o sexo feminino e masculino tanto relacionado ao tipo de infecção como a etiologia fúngica. Um estudo de coorte sobre onicomicose revelou que as infecções em unhas dos pés apresentam maior frequência nos homens e as unhas das mãos são mais

afetadas nas mulheres. Também foram observadas diferenças na etiologia fúngica, na qual os homens são mais infectados por dermatófitos, e nas mulheres a proporção de infecções por *Candida* spp. foi maior (Segal et al., 2015).

As dermatomicoses por leveduras do gênero *Candida* também são de grande expressão, sobretudo, nas onicomicoses, onde são responsáveis por cerca de 24 a 45% dos casos (Ilyas; Sharma, 2017; Shemer et al., 2020). Por anos, a espécie *C. albicans* permaneceu como principal agente etiológico de infecções das unhas, mas atualmente estudos apontam que a *Candida parapsilosis e Candida tropicalis* têm emergido e superado em número de casos de onicomicose. Embora de menor ocorrência, outras espécies como *Candida guilliermondii*, *Candida glabrata* e *Candida krusei* são importantes agentes microbianos, dada à resistência aos antifúngicos (Fich et al., 2019; Ge et al., 2019; Paškevičius et al., 2020).

No Brasil, estudos em diferentes regiões têm mostrado maior prevalência de *C. albicans* como agente etiológico. Em uma pesquisa conduzida na cidade de São Paulo, analisando 247 casos de onicomicoses, 52% foram causados por agentes do gênero *Candida*, sendo a espécie mais prevalente (18,3%) a *C. albicans* (Godoy-Martinez et al., 2009). No nordeste brasileiro, esta mesma espécie também foi a principal levedura isolada (28,6%), seguida pela espécie *C. parapsilosis* (21,4%) (Mobin et al., 2018). No centro-oeste do Brasil, a *C. albicans,* mais uma vez, foi o fungo mais isolado, representando 38,4% dos casos em 1.282 amostras (Souza et al., 2010). No Paraná, região sul, uma pesquisa observou que as leveduras foram os principais agentes responsáveis pelos casos de onicomicoses, representando 46,39%, dessa vez com destaque para a espécie *C. parapsilosis* (Souza et al., 2007).

2.2 Fungos dermatófitos

Taxonomicamente, os dermatófitos pertencem à ordem *Onycogenales*, família *Arthrodermataceae.* Anteriormente, os dermatófitos patogênicos foram classificados nos gêneros *Epidermophyton, Microsporum* e *Trichophyton,* no entanto, com o avanço das técnicas moleculares de identificação outros três gêneros foram acrescentados: *Nannizzia, Lophophyton* e *Arthroderma* (De Hoog et al., 2017). Apenas nos três primeiros gêneros existem mais de 40 espécies que afetam de 20 a 25% da população mundial (Baghi et al., 2016; Zhan; Liu, 2017). Neste contexto, destacam-se as

espécies *T. rubrum* e o complexo *T. mentagrophytes*, seguidos por *E. floccosum* e *M. canis* (Figura 4) (Monod, Méhul, 2019; Appelt et al., 2021).

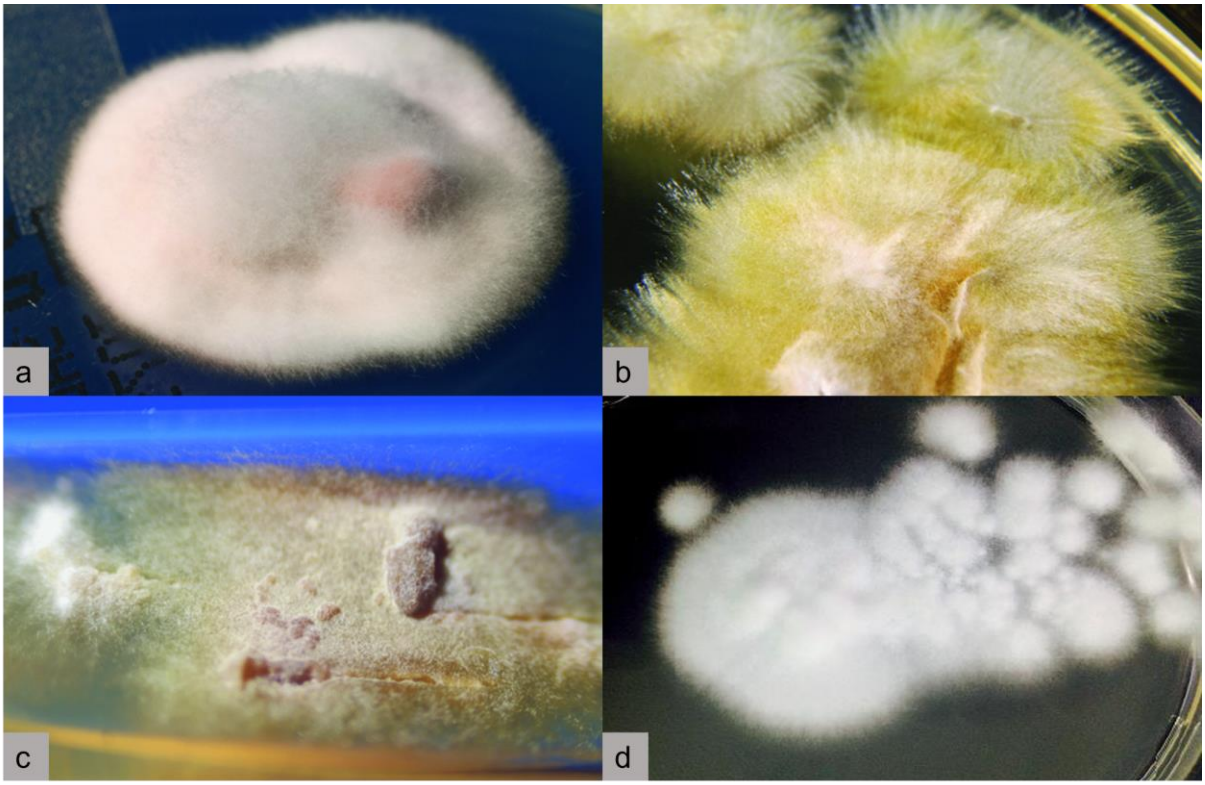

Figura 4. Culturas em ágar Sabouraud das principais espécies de dermatófitos. a. *Trichophyton rubrum:* colônia centro elevado e reverso com pigmento rubro ou vermelho na borda. b. *Microsporum canis*: colônia amarelada com talo radiante central branco, reverso cor amarelo ou alaranjado. c. *Epidermophyton floccosum*: colônia granular, amarelo claro (verde oliva) e aveludada, reverso castanho. d. *Trichophyton mentagrophytes:* colônia geralmente planas, de cor branca ou cremosa, com textura pulverulenta, granulosa ou aterciopelada, reverso castanho. Fonte: Nenoff et al., 2014; Rivas, Mühlhauser, 2015.

Os fungos dermatófitos são filamentosos, hialinos, septados e apresentam artroconídios em sua micromorfologia. A alta incidência desses fungos como causadores de dermatomicoses está relacionada a produção de queratinase, importante enzima utilizada para aquisição de nutrientes do ambiente, e que também contribui para a invasão fúngica do estrato córneo da epiderme e para a degradação da queratina da pele, cabelos e unhas (Di Chiacchio et al., 2014).

Estes fungos pertencem a três nichos ecológicos diferentes, classificados como antropofílicos (associados ao homem), zoofílicos (associados aos animais) ou geofílicos (habitantes do solo). Espécies de todos os nichos estão associadas a doenças clínicas em humanos. Antropófílicos, como *T. rubrum*, são mais prevalentes

e se apresentam como uma doença crônica com inflamação leve. Em contrapartida, a infecção causada por organismos geofílicos ou zoofílicos apresenta-se como uma doença grave com inflamação aguda (Achterman; White, 2013).

Os fungos dermatófitos infectam superfícies do corpo do hospedeiro contendo queratina, incluindo pele, cabelo e unhas (Sacheli et al., 2021). Desta forma, o mesmo patógeno pode causar infecções no pé, na unha, no corpo ou na cabeça. Fatores relacionados ao clima e estilo de vida contribuem para a prevalência de infecções por dermatófitos, na qual climas tropicais e superlotação predispõem as populações a infecções (Achterman; White, 2013).

Fatores predisponentes do hospedeiro também podem favorecer as infecções por dermatófitos, especialmente, distúrbios circulatórios, linfedema, deformidades e traumas nas unhas, diabetes mellitus, hiperidrose e imunossupressão. Distúrbios de queratinização que afetam a pele e as unhas, como o eczema atópico, ictiose vulgar, psoríase vulgar e psoríase unguium estão relacionados a predisposição a infecções por dermatófitos (Nenoff et al., 2014). Em um estudo realizado em países da Europa sobre a prevalência de infecções fúngicas ungueais na psoríase vulgar, de 228 pacientes com alterações ungueais e psoríase vulgar, 62% apresentaram cultura fúngica positiva, na qual em 67% desses pacientes foram isolados dermatófitos e em 24% leveduras (Zisova et al., 2013).

Embora diversos fatores relacionados ao hospedeiro possam favorecer a ocorrência das dermatofitoses, os fatores de virulência dos fungos também devem estar presentes para que ocorra a infecção. Durante o processo infeccioso diversos fatores de virulência são produzidos como enzimas hidrolíticas que possibilitam a degradação da queratina; alterações metabólicas determinantes para utilização de nutrientes do tecido hospedeiro; adaptação ao pH com fatores de transcrição que regulam a adaptação fúngica ao estresse; e vesículas extracelulares que modulam a resposta imune do hospedeiro (Sardana; Gupta; Mathachan, 2021).

Mecanismos complexos de sinalização intracelular são ativados para o processo de adesão, penetração e manutenção dos dermatófitos no tecido. A primeira interação com o pH ácido (4,7) do tecido hospedeiro desencadeiam a expressão de genes que codificam proteases, lipases e adesinas (Martinez-Rossi, 2021). No caso dos dermatófitos a estrutura-alvo para infecção e proliferação destes no estrato córneo da epiderme é a citoqueratina, encontrada na pele, cabelos e unhas. Tais fungos degradam essas complexas proteínas via queratinase e a adesão ao tecido epitelial

do hospedeiro, que contém queratina, é mediada por mananoglicoproteínas da parede celular do fungo (Nenoff et al., 2014).

O início da infecção por dermatófitos começa quando porções infecciosas chamadas artroconídios aderem a tecidos queratinizados (Figura 5). Os artroconídios primeiramente aderem à epiderme dentro de 2 a 6 horas após o contato e começam a germinar no estrato córneo (Moskaluk; Vandewoude, 2022). Adesinas presentes na parede celular fúngica são cruciais para a fixação inicial, moléculas implicadas neste processo, por exemplo, incluem a protease da família subtilisina em *M.canis* e a dipeptidil-peptidase IV (DppIV) das espécies de *Trichophyton* (Monod et al, 2005; Baldo et al, 2010).

Em seguida ocorre a germinação, onde os artroconídios germinam e as hifas penetram rapidamente no estrato córneo para evitar a eliminação por descamação celular, que ocorre dentro de 3 a 4 horas. Entre 24 horas e 3 dias, as hifas se espalham pela pele, os artroconídios tornam-se planos e as estruturas semelhantes a fibrilas tornam-se curtas e finas para invadir as camadas mais profundas da epiderme, aumentando a superfície de contato com o tecido hospedeiro para maior aquisição de nutrientes (Duek et al., 2004; Sardana; Gupta; Mathachan, 2021). Após a formação de novos artroconídios, dentro de 7 dias após a infecção, o fungo além de se espalhar para outras localizações anatômicas do hospedeiro, também pode contaminar outros hospedeiros ou o ambiente (Moskaluk; Vandewoude, 2022).

A degradação da queratina é causada por queratinases e parece ser facilitada por uma bomba de efluxo de sulfito, na qual a secreção do composto redutor, sulfito, quebra as ligações de cisteína que estabilizam a queratina. Os dermatófitos podem formar sulfito a partir da cisteína encontrada no meio ambiente, sendo mediada pela enzima cisteína dioxigenase e suportada pela bomba de efluxo de sulfito. Tal processo é importante para o controle da quantidade de cisteína, visto que em concentrações elevadas apresenta efeito tóxico aos fungos, bem como para os seres humanos (Grumbt et al., 2013; Nenoff et al., 2014).

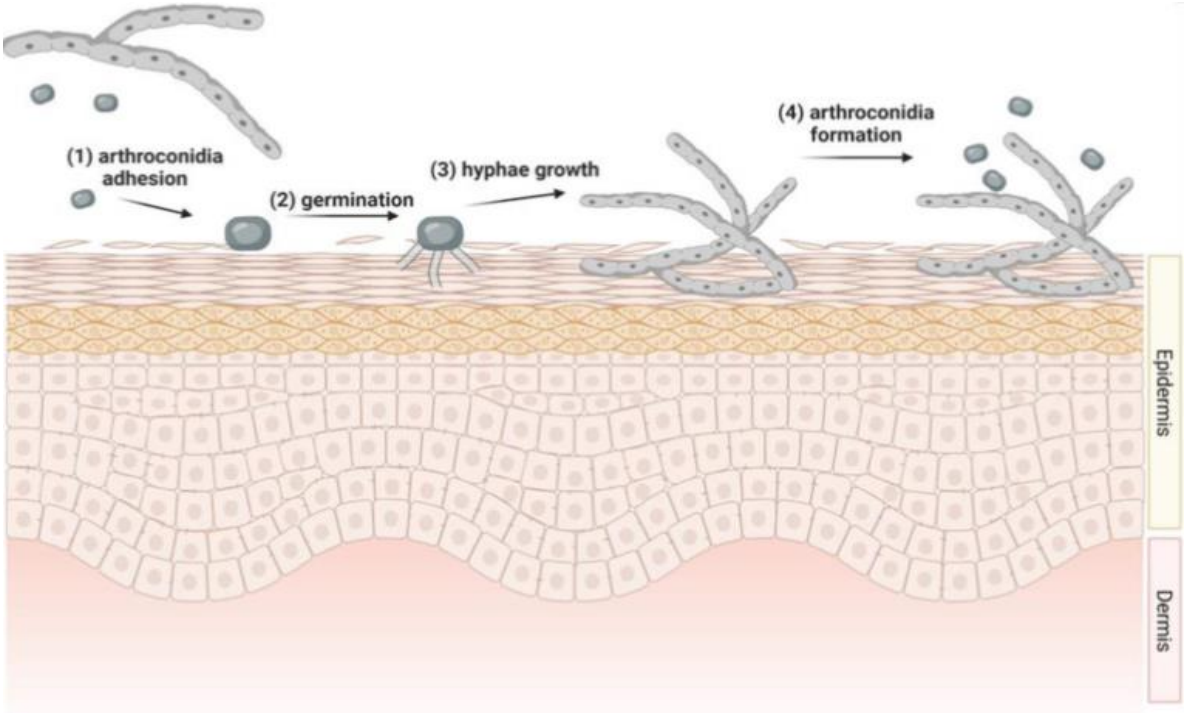

Figura 5. Processo da infecção por dermatófitos na pele. (1) Artroconídios do ambiente ou de outro hospedeiro infectado entram em contato com a pele do novo hospedeiro. A adesão à pele ocorre entre 2 a 6 horas após o contato. (2) Artroconídios começam a germinar na camada superior da epiderme, formando tubos germinativos. (3) As hifas continuam a crescer dentro da epiderme. (4) Dentro de 7 dias após a infecção, os artroconídios são formados, permitindo que o ciclo se repita. Fonte: (Moskaluk; Vandewoude, 2022).

2.3 Leveduras do gênero *Candida*

As micoses causadas por leveduras do gênero *Candida* são de extrema importância clínica, sendo denominadas candidíases ou candidoses, e são consideradas doenças oportunistas com características clínicas que variam desde superficiais até invasivas (Silva et al., 2012; Sardi et al., 2013). Essas leveduras colonizam frequentemente o ser humano, na qual de 20 a 40% da população adulta saudável apresenta colonização da mucosa bucal, sendo a frequência maior ainda na colonização do trato gastrointestinal, de 20 a 80% das pessoas. Nas mulheres, a colonização por *Candida* na região vaginal ocorre entre 20 e 30% (Barbedo; Sgarbi, 2010; Cauchie; Desmet; Lagrou, 2017).

Assim, essas leveduras vivem como comensais na microbiota dos seres humanos e animais, e em geral, não causam nenhum dano ao hospedeiro. Contudo, em indivíduos com distúrbios relacionados às proteções físicas, químicas e imunológicas, esses fungos podem tornar patogênicos e causar infecções (Sidrim; Rocha, 2010). Neste contexto, a espécie *C. albicans* é o agente mais comum, mas espécies como *C. tropicalis, C. krusei, C. glabrata, C. parapsilosis* são fontes adicionais, na qual diversas pesquisas demonstram incidências variáveis quanto à etiologia por leveduras nas dermatomicoses (Armon et al., 2020; Gupta et al., 2020b; Rather et al., 2021).

Na candidíase ungueal a espécie *C. albicans* também se destaca, seguida pelas espécies *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (Fich et al., 2019; Sylla et al., 2019; Gupta et al., 2020b). No caso da onicomicose primária por *Candida*, o ataque geralmente inicia-se como uma paroníquia, raramente com uma simples onicólise. Na onicomicose secundária, a *Candida* é um colonizador e não o agente infeccioso, e está associada a um trauma, psoríase, alergia crônica ou paroníquia traumática (Feuilhade, 2014). Em pacientes com psoríase vulgar a colonização de *Candida* nas unhas dos pés é significativamente maior (Ständer; Ständer; Nolting, 2001).

A levedura *C. albicans* difere, principalmente dos dermatófitos em sua capacidade de infectar diferentes sítios do seu hospedeiro, devido aos seus fatores de virulência. Este fungo pode crescer como levedura em formato ovóide, células alongadas elipsóides ou ainda formar hifas com paredes paralelas. Essas variações morfológicas são induzidas por fatores do hospedeiro como a temperatura corporal, alterações no pH da região colonizada e presença de N-acetilglucosamina. As hifas demonstram ser mais invasivas do que a morfologia leveduriforme, porém o formato de levedura tem se mostrado mais eficaz no processo de disseminação (Sudbery, 2011).

A levedura *Candida auris* é diferente das outras espécies de *Candida*, pois a maioria dos casos de candidíase surge da microbiota do hospedeiro, mas a *C. auris* não é considerada comensal. Essa espécie tem uma predileção particular pela pele, particularmente a axila e a virilha, e tem o potencial de colonizar hospedeiros dentro de dias a semanas de exposição, e causar infecções invasivas dentro de dias a meses após a colonização (Day et al., 2018; Forsberg et al., 2019). Além disso, é considerada uma espécie multirresistente, apresentando variáveis padrões de resistência à muitos

antifúngicos usados para tratar infecções por outras espécies de *Candida* (Sikora; Hashmi; Zahra, 2023).

2. 4 Diagnóstico laboratorial das dermatomicoses

O diagnóstico das dermatomicoses causadas por dermatófitos e leveduras do gênero *Candida* baseia-se na realização de exame direto de esfregaços de pele e unhas com o auxílio de hidróxido de potássio (KOH) ou de corantes como o azul de metileno ou pela técnica de coloração de Gram, para observação de estruturas fúngicas microscópicas (Hospenthal; Rinaldi, 2015). O padrão ouro de diagnóstico envolve o isolamento e identificação do fungo através de cultura, na qual as amostras clínicas são inoculadas em meios de cultura que permitem o crescimento do agente fúngico (Quindós et al., 2012; Oren; Paul, 2014).

O exame direto apresenta uma sensibilidade de aproximadamente 61% e especificidade de 95%, entretanto não permite especificar o tipo de organismo patogênico (Velasquez-Agudelo; Cardona-Arias, 2017). A cultura fúngica é de alta especificidade e baixa sensibilidade e após crescimento em meio específico, a etapa posterior inclui a identificação do microrganismo por análise adicionais da fisiologia e de estruturas micromorfológicas (Gupta et al., 2022).

Em cultura, os dermatófitos produzem hifas septadas que se ramificam e formam o micélio com os conídios, estruturas de reprodução assexuada. Microscopicamente, esses conídios diferem entre as espécies quanto à forma, ao tamanho, ao número e à disposição ao longo das hifas, sendo critérios essenciais para a identificação (Sidrim; Rocha, 2004).

Ensaios moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), citometria de fluxo e espectrometria de massa são ferramentas avançadas de diagnóstico, contudo, as duas últimas são técnicas empregadas em pesquisas, não fazendo parte de protocolos de rotina laboratorial (Lim et al., 2021). A PCR em tempo real é a forma mais usada, pois é relativamente simples de conduzir e pode detectar vários organismos. Os métodos moleculares envolvendo PCR apresentam sensibilidade de 85 a 100% e especificidade de 94 a 100% na detecção de dermatófitos, porém não estão amplamente disponíveis devido ao custo (Watanabe; Ishida, 2017). A citometria de fluxo separa as células de acordo com o tamanho,

granulosidade e presença de marcadores de DNA e proteínas. A espectrometria de massa envolve o carregamento de espécies químicas e a separação de íons de acordo com sua razão massa-carga (Lim et al., 2021).

2. 5 Tratamento das dermatomicoses

O tratamento dessas micoses baseia-se no uso de antifúngicos, que podem ser tópicos, sistêmicos ou uma associação entre eles. O tratamento sistêmico com antifúngicos é considerado, principalmente, em casos de *Tinea capitis*, onicomicose e durante hiperqueratose significativa (Samanta, 2015). Quadros mais simples de dermatofitoses, utiliza-se, geralmente, creme de ciclopirox olamina, terbinafina, butenafina e naftifina (Ginter-Hanselmayer, 2012; Kaul; Yadav; Dogra, 2017; Khurana; Sardana, 2018). O tratamento sistêmico é realizado principalmente pelos azólicos, terbinafina e griseofulvina (Lakshmipathy; Kannabiran, 2010; Pires et al., 2014; Kaul; Yadav; Dogra, 2017).

Na terapêutica das candidíases cutâneas é comum o uso de pomadas e cremes à base de nistatina, clotrimazol, terbinafina e cetoconazol (Barbedo; Sgarbi, 2010; Bassetti; Peghin; Timsit, 2016). Nos casos mais severos das infecções na pele por leveduras, ou ainda se houver um quadro disseminado, é recomendado a terapia oral, com a utilização de antifúngicos de três principais classes: azólicos (fluconazol e itraconazol), poliênicos (anfotericina B) e equinocandinas (micafungina) (Barbedo; Sgarbi, 2010; Rotta et al., 2013; Datta et al., 2018).

Os azólicos mais utilizados são os fungistáticos fluconazol e itraconazol que atuam sobre a monooxigenase lanosterol 14-alfa-demetilase (citocromo P-450-dependente), enzima necessária para a conversão do lanosterol em ergosterol (Doğan et al., 2017). O tratamento com esses fármacos ocorre, normalmente, em pacientes que não toleram ou não respondem à terbinafina oral, e ainda nos casos de onicomicoses quando o agente causador é uma levedura ou fungo filamentoso não dermatófito (Shafiei et al., 2020).

A terbinafina, uma alilamina sintética, é o fármaco frequentemente preferencial, sendo utilizada por via oral ou tópica, e tem seu mecanismo de ação baseado na inibição da enzima esqualeno-epoxidase que, por conseguinte, bloqueia a síntese de ergosterol (Campoy; Adrio, 2017; Maxfield et al., 2022). A griseofulvina é utilizada no tratamento de micoses cutâneas e onicomicoses dermatofíticas, sendo um antifúngico

sistêmico administrado por via oral, que após a penetração na célula fúngica interage com os microtúbulos desfazendo o fuso mitótico, provocando uma inibição do processo de mitose e, consequentemente na multiplicação do microrganismo (Yesudian; Yesudian; Yesudian, 2021).

Os antifúngicos orais, como terbinafina e itraconazol, são a primeira escolha de tratamento, no entanto, apresentam diversos efeitos colaterais, interações medicamentosas e longo tempo de tratamento, o que reflete na baixa adesão do paciente ao tratamento, acarretando altas taxas de recidiva. Além disso, tratamentos prolongados estão associados ao desenvolvimento de novas patologias, como doença hepática crônica ou aguda e insuficiência renal (Gupta; Paquet; Simpson, 2013; Gupta et al., 2020b).

A grande preocupação envolvendo o tratamento de infecções é o desenvolvimento de resistência aos fármacos pelos microrganismos. Há diferentes mecanismos que contribuem para o desenvolvimento de resistência antifúngica, na qual espécies de fungos podem ser naturalmente resistentes aos antifúngicos, ou ainda a exposição a drogas antifúngicas pode promover a longo prazo a resistência secundária (Gupta; Venkataraman, 2022).

A resistência aos azólicos é frequentemente relatada em dermatófitos e em espécies de *Candida* (Gupta; Venkataraman, 2022). Adicionalmente, a resistência aos fungistáticos azólicos em dermatófitos é mais provável em comparação com as alilaminas, que são fungicidas. Contudo, a resistência à terbinafina foi relatada em *Microsporum* spp. e *Trichophyton* spp. e está associada a mutações em genes que codificam a enzima esqualeno epoxidase (Andersen; Jemec; Saunte, 2020; Gupta et al., 2021). Assim, a resistência está relacionada, principalmente, às mutações em genes que codificam o alvo da droga e a regulação de bombas de efluxo (Ksiezopolska; Gabaldon, 2018). Além do mais, falhas no tratamento associadas ao hospedeiro como insuficiência na forma do tratamento relacionada à dose e duração, e baixa adesão do paciente contribuem para os casos de resistência (Gupta; Venkataraman, 2022).

2.6 Compostos derivados de chalconas

Chalconas são um dos principais metabólitos secundários de plantas pertencentes à família dos flavonoides, principalmente, plantas comestíveis. Grande

parte das chalconas são compostos aromáticos polihidroxilados e são bioprecursores de flavonoides de cadeia aberta, flavonoides e isoflavonoides (Rudrapal et al., 2021). Devido à presença de grupos fenólicos, apresentam a propriedade de eliminação de radicais, o que despertou o interesse científico de investigar extratos de plantas ricos em chalconas para a busca de compostos terapêuticos (Ouyang et al, 2021).

Esses compostos também são conhecidos como benzalacetofenona ou benzilideno acetofenona, e são cetonas α,β-insaturadas contendo um grupo cetoetilênico reativo (–CO-CH=CH-). Quimicamente, as chalconas são 1,3-diaril-2-propen-1-ona, na qual dois anéis aromáticos são ligados por um sistema carbonílico alifático de três carbonos α,β-insaturado (Figura 6) (Rudrapal et al., 2021).

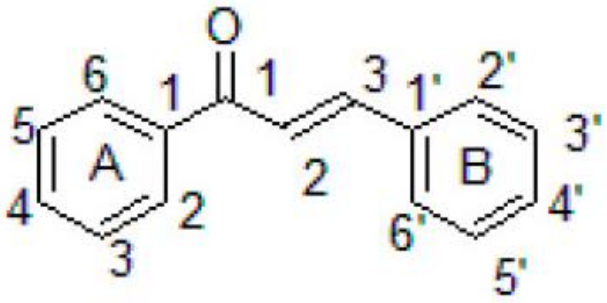

Figura 6. Estrutura química das chalconas. Fonte: Rudrapal et al., 2021.

As chalconas possuem ligações duplas conjugadas e um sistema de elétrons completamente deslocalizado em ambos os anéis de benzeno. Eles constituem o esqueleto de flavonoides de cadeia aberta em que o sistema alifático de três carbonos é usado como um adjunto entre dois anéis aromáticos A e B. São moléculas pequenas, de baixo peso molecular (na faixa de 300–600 g/mol), não quirais com lipofilicidade relativamente alta (Zhuang et al., 2017).

Chalconas são um dos tipos mais importantes de produtos naturais obtidos de fontes sintéticas e naturais, que podem a partir da sua estrutura principal formar diferentes compostos derivados (Mirzaei; Keighobadi; Emami, 2017). As chalconas e seus derivados são frequentemente alvos de estudos, sendo já descrito uma ampla gama de atividades quimioterapêuticas, incluindo anticâncer (Letafat et al., 2013; Ketabforoosh et al., 2014), antibacterianas (Nowakowska, 2007; Mahapatra; Bharti; Asati, 2015) e antifúngicas (Sivakumar; Kumar; Doble, 2009; Mirzaei; Abastabar; Emami, 2020).

As chalconas apresentam grande potencial de exploração pela Química Medicinal devido a sua fácil síntese e habilidade de interagir com múltiplos alvos biológicos aliada a alta tolerabilidade pelos humanos. Neste contexto, a diversidade de compostos chalcônicos conferem a estas substâncias um amplo espectro de ações biológicas, incluindo uma promissora atividade antifúngica (Gupta; Jain, 2015; Andrade et al., 2018; Nascentes et al., 2020), além de ser anti-inflamatório (Ventura et al., 2015; Xiao, 2018), antioxidante (Doan; Tran, 2011) e antiproliferativas (Takac et al., 2020; Michalkova et al., 2021).

Atividade antimicrobiana de compostos derivados de chalconas já foi relatada para diferentes agentes microbianos como vírus (Duran et al., 2021; Mothana et al., 2022; Valipour, 2022), protozoários (Yadav et al., 2012; De Mello et al., 2018), bactérias (Nowaska, 2007; Marques et al., 2020), fungos filamentosos (López et al., 2001; Gładkowski et al, 2023) e leveduras (Wang et al., 2016; Andrade et al., 2018; Marques et al., 2020).

3 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

As dermatofitoses afetam cerca de um quarto da população mundial, ocorrendo, principalmente, em países de clima tropical e úmido, favorecendo o crescimento destes fungos (Silva-Rocha; De Azevedo; Chaves, 2017). Nos últimos anos, essas infecções apresentaram índices de crescimento de aproximadamente 10% nos ambientes hospitalares. Em pacientes transplantados, as infecções dermatofíticas também estão se tornando comuns com taxas de até 5,6%. A espécie *T. rubrum* é a mais presente nestes indivíduos, provocando infecções mais profundas e recorrentes (Hofbauer et al., 2014; Ilyas; Sharma, 2017).

As onicomicoses se destacam dentre as micoses cutâneas, sendo responsável por 30% de todas as infecções fúngicas de pele e 50% das doenças de unhas, afetando de 5% a 20% da população mundial, e até 30% em grupos de risco, podendo nestes gerar sequelas graves quando negligenciadas (Rotta et al., 2013; Ilyas; Sharma, 2017; Gupta et al., 2020a). Observando os casos por dermatófitos as taxas correspondem a 90% de todas as infecções de unha dos pés e 50% de unha das mãos (Babayani et al., 2018).

Onicomicoses são infecções cujos sintomas físicos, como dores e desconforto, e implicações psicológicas são comuns. As pessoas afetadas estão menos dispostas a participar de atividades sociais e de lazer, promovendo impactos ao bem-estar mental (Gupta et al., 2020b). O impacto econômico é relevante uma vez que os gastos são elevados aos serviços de saúde entre consultas médicas e tratamentos (Leung et al., 2019).

O tratamento longo e dispendioso com antifúngicos pode levar a efeitos adversos como hepatoxicidade e nefrotoxicidade. A baixa adesão terapêutica, possibilita o aumento de casos de infecções recorrentes e recalcitrantes, e o surgimento de microrganismos resistentes aos antifúngicos (Lipner et al., 2021). Assim, a eficiência dos antifúngicos convencionais fica cada vez mais limitada devido ao surgimento do fenótipo de resistência em linhagens fúngicas, além de casos reportados para efeitos adversos e interações cruzadas com outros fármacos. A consequência disto é a necessidade imperativa do desenvolvimento de novos fármacos que sejam mais seguros e eficazes (Hofbauer et al., 2014; Ilyas; Sharma, 2017).

Em tal conjuntura, a busca por novas substâncias antimicrobianas a partir de fontes naturais, sobretudo as plantas, têm ganhado importância, sendo alvo de constantes pesquisas (Ramos et al., 2016). As substâncias ativas presentes nas plantas, possuem diferentes esqueletos, incluindo os fenóis, flavonoides, alcaloides e taninos, os quais fazem parte da proteção antimicrobiana vegetal (Ferreira et al., 2015).

Nesta área, temos em destaque as chalconas, na qual por diversidade de compostos chalcônicos conferem a estas substâncias um amplo espectro de ações biológicas, incluindo uma promissora atividade antimicrobiana (Mirzaei; Abastabar; Emami, 2020), de terapia para câncer (Leon-Gonzalez et al., 2015), além de ser anti-inflamatório (Ventura et al., 2015) e antioxidante (Doan; Dao, 2011).

Desta forma, através dessa pesquisa, ao avaliar a atividade antifúngica de diferentes compostos sintetizados a partir da estrutura química das chalconas, objetivamos contribuir no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de micoses, sobretudo as dermatomicoses causadas por dermatófitos.

4 OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar a atividade antifúngica de compostos químicos derivados de chalconas contra linhagens de fungos dermatófitos e leveduras do gênero *Candida*.

4.1 Objetivos específicos

a) Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), *in vitro,* e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) de compostos derivados de chalconas frente às linhagens dos dermatófitos *T. rubrum*, *T. mentagrophytes, M. canis* e *E. floccosum;* e linhagens das leveduras *C. albicans, C. parapsilosis, C. glabrata* e *C. auris;*
b) Identificar o perfil de suscetibilidade, *in vitro,* das linhagens de *T. rubrum*, *T. mentagrophytes, M. canis, E. floccosum, C. albicans, C. parapsilosis, C. glabrata* e *C. auris* frente aos antifúngicos convencionais fluconazol, itraconazol, griseofulvina e terbinafina;
c) Analisar o efeito combinatório, *in vitro*, do composto derivado de chalcona com fluconazol, itraconazol, griseofulvina e terbinafina frente aos fungos;
d) Investigar o alvo de ação do composto sobre a membrana citoplasmática e parede celular fúngica;
e) Estabelecer a cinética de morte - *Time kill* das cepas fúngicas na presença do composto derivado de chalcona;
f) Avaliar a toxicidade do composto derivado de chalcona em modelo invertebrado de *Galleria mellonella*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Linhagens fúngicas

Neste estudo foram utilizadas linhagens clínicas e de referência de fungos pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP (São Paulo, Brasil) e da *American Type Culture Colection* (*ATCC*) e do *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS) (Tabela 1).

Tabela 1. Isolados de dermatófitos e *Candida* utilizados, segundo código de identificação e origem da cepa.

Espécie	Código da cepa	Origem
T. rubrum	TRCBS	Cepa de referência - CBS
	TR7984	Cepa clínica - FAMERP
	TR6284	Cepa clínica - FAMERP
T. mentagrophytes	TMATCC	Cepa de referência - ATCC
	TM6007	Cepa clínica - FAMERP
	TM6085	Cepa clínica - FAMERP
E. floccosum	EF6050	Cepa clínica - FAMERP
	EF6069	Cepa clínica - FAMERP
	EF8233	Cepa clínica - FAMERP
M. canis	MCATCC	Cepa de referência - ATCC
	MC8168	Cepa clínica - FAMERP
	MC8295	Cepa clínica - FAMERP
C. albicans	CAATCC	Cepa de referência - ATCC
	CA7772	Cepa clínica - FAMERP
C. parapsilosis	CPATCC	Cepa de referência - ATCC
	CP7837	Cepa clínica - FAMERP
C. glabrata	CGATCC	Cepa de referência - ATCC
	CG6930	Cepa clínica - FAMERP

C. auris	CAUCBS	Cepa de referência - CBS
	CAU491	Cepa clínica - FAMERP

ATCC*: American Type Culture Colection*.

CBS: *Centraalbureau voor Schimmelcultures*.

Todos os isolados estão registrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen).

Os fungos foram reativados do congelamento em caldo Sabouraud dextrose (CSD - Oxoid, Basingstoke, Hants, UK) e em seguida os dermatófitos foram semeados em ágar batata dextrose (ABD - Oxoid, Basingstoke, Hants, UK) com incubação a 35ºC por 7 dias e as leveduras em ágar Sabouraud dextrose (ASD - Oxoid, Basingstoke, Hants, UK) com incubação a 37ºC por 24 horas para a realização dos ensaios *in vitro*.

5.2 Síntese dos compostos químicos derivados de chalconas

Os compostos foram produzidos e fornecidos, para os ensaios *in vitro* com fungos, pelo laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. Os compostos foram obtidos por meio de reações de condensação aldólica, utilizando etanol como solvente (5 mL) e KOH (60% m/v, 2 mL) a 0°C como catalisador (Santos et al., 2019; Santos et al., 2017). O meio reacional foi mantido sob agitação por 2 a 6 horas a temperatura ambiente. Após o término da reação, o meio reacional foi vertido sob gelo, sendo filtrada com acetato de etila (3 × 25 mL). As fases orgânicas foram combinadas e lavadas com solução aquosa de NaHSO (2 × 10 mL) e secas em MgSO4. A filtração ocorreu sob pressão reduzida, obtendo após separação cromatográfica chalcona com rendimento em torno de 40%, após a purificação. A caracterização da chalcona incluiu espectros de espectroscopia por ressonância magnética nuclear e cromatogramas. No total foram utilizados 6 compostos derivados de chalconas com estrutura química diversificada, conforme Figura 7. Os compostos resultantes em massa foram solubilizados em solução de água destilada estéril com dimetil sulfóxido (DMSO) a 10%.

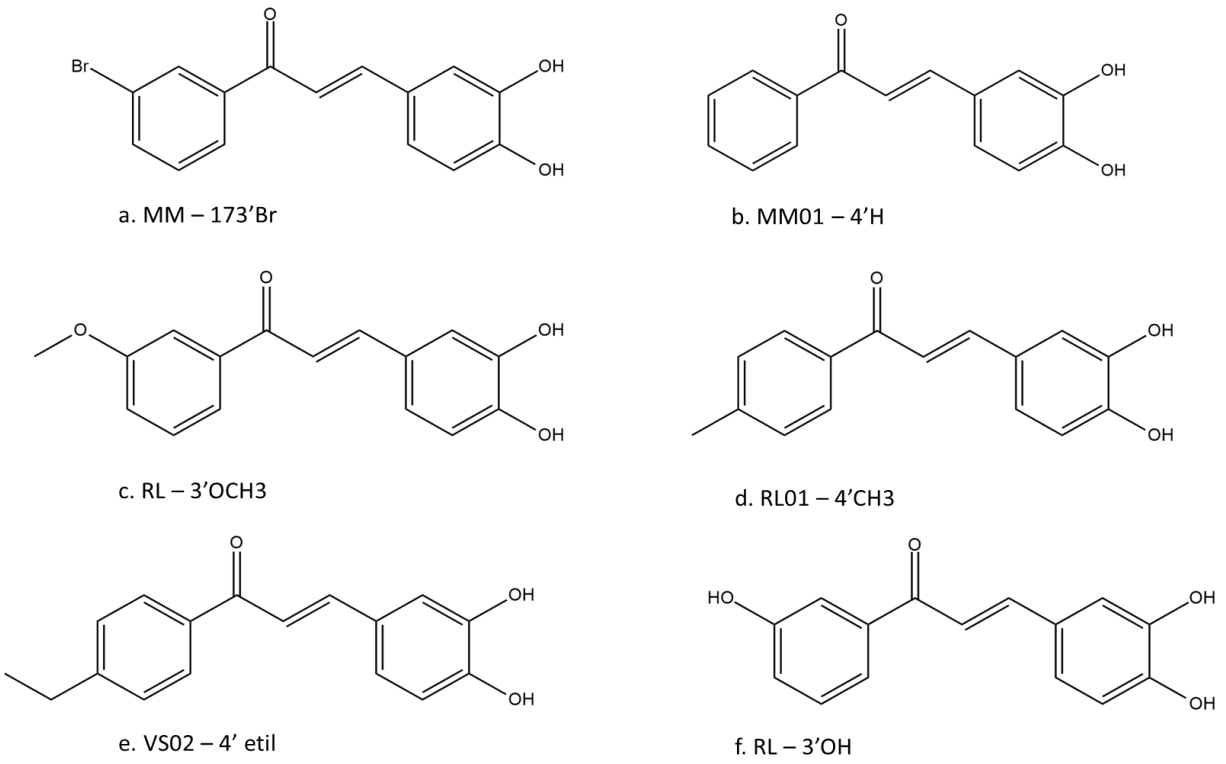

Figura 7. Estrutura química dos compostos derivados de chalconas.

5.3 Triagem dos compostos derivados de chalconas através do perfil de suscetibilidade

Inicialmente, foram realizados testes de triagem com os seis compostos derivados de chalconas para avaliar a atividade antifúngica contra as cepas de *T. rubrum* (TR7984)*, T. mentagrophytes* (TM6085) e das espécies de *Candida* (CA7772, CP7837, CGATCC e CAUCBS) para a escolha do composto com melhor ação para o seguimento dos ensaios *in vitro*. O perfil de suscetibilidade das cepas selecionadas frente aos compostos foi determinado por técnica de microdiluição de acordo com o protocolo descrito no documento M38 - 3rd para os dermatófitos e M27- 4rd para as leveduras, produzido pelo *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI), com modificações (CLSI, 2017a, b), conforme descrição da técnica na seção 5.4.

Para a realização do teste de microdiluição foram utilizadas concentrações dos compostos entre 250 µg/mL e 0,48 µg/mL. A CIM foi estabelecida como a menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento. A determinação da CFM foi realizada após a leitura do teste de microdiluição, para isso uma alíquota de cada poço das placas preparadas com os compostos foi transferida em placas de *Petri* contendo

ASD com o auxílio de hastes de madeira estéreis. A CFM foi definida como a menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento fúngico, ou seja, não formando colônia sobre o meio de cultura. Todos os testes foram realizados em triplicata.

5.4 Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das linhagens de dermatófitos e leveduras frente ao composto derivado de chalcona e aos fármacos fluconazol, itraconazol, griseofulvina e terbinafina

O perfil de suscetibilidade das cepas selecionadas frente aos compostos e fármacos foi determinado por técnica de microdiluição de acordo com o protocolo descrito no documento M38 - 3rd para os dermatófitos e M27- 4rd para as leveduras, produzido pelo *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI), com modificações (CLSI, 2017a, b). Nesta etapa foram utilizadas as cepas dos dermatófitos *T. rubrum* (TRCBS, TR7984, TR6284)*, T. mentagrophytes* (TMATCC, TM6085, TM 6007), *M. canis* (MCATCC, MC8168, MC8295) e *E. floccosum* (EF6050, EF6069, EF8233), bem como, as leveduras *C. glabrata* (CGATCC, CG6930) e *C. auris* (CAUCBS, CAU491).

Os dermatófitos foram cultivados em ABD com incubação a 35°C por 7 dias. Após esse período o inóculo foi preparado, para isso a superfície da colônia foi coberta com 5 mL de salina estéril (0,85%) e raspada com alça estéril. A mistura de conídios e fragmentos de hifas foi transferida para um tubo estéril, permanecendo por 15 minutos para a precipitação de estruturas mais pesadas. Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para novo tubo estéril com homogeneização em vórtex por 15 segundos. O inóculo foi ajustado em espectrofotômetro com leitura a 530 nm, seguido de diluição na proporção 1:50 em meio RPMI – 1640 (Rosen Park Media Institute - Sigma-Aldrich®*)* com concentração final de 0,4 a 5 x 10^4 unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL). Na etapa final 0,1 mL da suspensão de inóculo foi inoculada em placas de poliestireno de 96 poços previamente preparada com o meio RPMI-1640 e as substâncias testadas.

Para o preparo do inóculo de leveduras, suspensões de colônias com crescimento de 24 horas em ASD foram realizadas em salina estéril 0,85%. O inóculo foi ajustado em espectrofotômetro com leitura a 530 nm, seguido de diluição na proporção 1:100 e posteriormente 1:20 em meio RPMI – 1640, com obtenção de uma

concentração final de inóculo de 5 x 10^2 – 2,5 x 10^3 UFC/mL. Na etapa final 0,1 mL da suspensão de inóculo foi inoculada nas placas previamente preparadas com o meio RPMI-1640 e as substâncias testadas.

Na preparação das placas de 96 poços o composto derivado de chalcona de melhor atividade antifúngica no teste de triagem foi diluído de forma seriada em meio RPMI-1640, atingindo concentrações de 1.000 µg/mL a 1,95 µg/mL para as leveduras e 250 µg/mL a 0,48 µg/mL para os dermatófitos. Da mesma forma, os fármacos foram preparados em diluições seriadas nas seguintes concentrações: fluconazol 256 µg/mL a 0,5 µg/mL, terbinafina 8 µg/mL a 0,015 µg/mL, itraconazol e griseofulvina 16 a 0,03 µg/mL, este último foi testado apenas contra os fungos filamentosos, devido uso em protocolos de tratamento contra dermatófitos. Também foram incluídos nas placas poços de controle de esterilidade (contendo 0,2 mL de RPMI) e de crescimento (contendo 0,1 mL de RPMI-1640 e 0,1 mL de inóculo).

As placas após inoculadas foram incubadas a 35°C, com leitura visual após 48 horas nos ensaios com leveduras e após 120 horas para os dermatófitos. A CIM dos fármacos fluconazol e itraconazol foi determinada como a menor concentração capaz de inibir 80% do crescimento fúngico, para os fármacos griseofulvina e terbinafina, assim como, para os compostos, a CIM foi estabelecida como a menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento. Os testes foram realizados em triplicata.

A determinação da CFM foi realizada após a leitura do teste de microdiluição, para isso uma alíquota de cada poço das placas preparadas com os compostos foi transferida em placas de *Petri* contendo ASD com o auxílio de hastes de madeira estéreis. A CFM foi definida como a menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento fúngico, ou seja, não formando colônia sobre o meio de cultura. Os testes foram realizados em triplicata.

5.5 Ensaio *Checkerboard*

A avaliação do efeito combinatório entre o composto derivado de chalcona com itraconazol, fluconazol, griseofulvina e terbinafina foi realizada por meio de ensaio de *Checkerboard*, baseado no protocolo M27- Ed4 (CLSI, 2017) e no estudo de Lemes et al. (2023). Para este ensaio foram selecionadas as linhagens de dermatófitos TRCBS e TR7984, e as cepas de referência ATCC de *C. glabrata* e CBS *de C. auris*,

na qual o inóculo foi preparado seguindo as mesmas etapas do método de microdiluição (seção 5.4).

As placas de 96 poços foram preparadas com 0,1 mL de RPMI-1640 em todos os poços, os fármacos foram adicionados e diluídos em diferentes intervalos de concentrações, na qual variaram: itraconazol 16 – 0,03 µg/mL, fluconazol 128 – 0,5 µg/mL, terbinafina 64 – 0,007 µg/mL e griseofulvina 4 – 0,06 µg/mL (testada apenas para dermatófitos, devido uso em protocolos de tratamento). Posteriormente, o composto foi adicionado e diluído nas concentrações de 125 – 0,12 µg/mL nos ensaios para dermatófitos e 1.000 – 0,97 µg/mL nos ensaios para leveduras. Adicionalmente, 0,1 mL do inóculo foi distribuído em cada poço. Foi reservado na placa um poço para controle de crescimento com 0,1 mL de RPMI-1640 e 0,1 mL do inóculo. Os fármacos e o composto também foram testados separadamente como forma de controle e comparação do efeito combinatório (Figura 8).

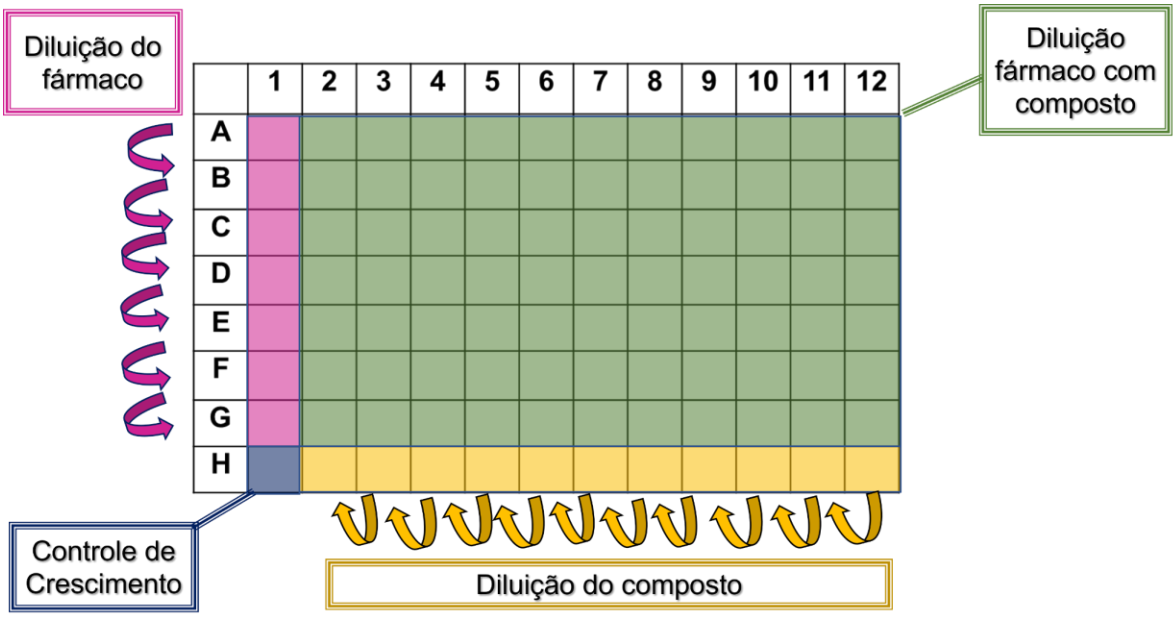

Figura 8. Layout do ensaio *Checkerboard* para avaliação do efeito combinatório do composto com os fármacos fluconazol, itraconazol, griseofulvina e terbinafina.

As microplacas foram incubadas a 35°C por 48 horas nos ensaios com leveduras e 120 horas nos ensaios para dermatófitos. Após esse período, a leitura visual das placas foi realizada. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Para avaliação da interação entre o composto e os fármacos foi utilizada a fórmula de Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF):

$$ICIF = \frac{CIM\ do\ fármaco\ no\ mix}{CIM\ do\ fármaco\ isolado} + \frac{CIM\ do\ composto\ no\ mix}{CIMdo\ composto\ isolado}$$

A partir do cálculo de ICIF a interação foi avaliada seguindo a classificação descrita por Kumar e colaboradores (2012), sendo: ≤ 0,5 para ação sinérgica; >0,5 - ≤ 1 para ação aditiva; >1 - ≤ 2 para indiferente; > 2 para ação antagônica.

5.6 Ensaio com sorbitol e ergosterol

Para o estudo do alvo de ação do composto, ensaios com sorbitol e ergosterol foram efetuados para determinação sobre parede celular e membrana citoplasmática, respectivamente. O sorbitol atua como um osmoprotetor que permite o crescimento das células na presença de um inibidor da síntese da parede celular fúngica (Svetaz et al., 2007). Já o ergosterol, substância presente na membrana celular fúngica, quando fornecido de forma exógena impede a ligação do composto antifúngico ao ergosterol da membrana fúngica, sendo evidenciado pelo aumento da CIM (Escalante et al., 2008).

Neste ensaio, foi utilizado a técnica de microdiluição com base nos documentos da CLSI: M38 - 3rd (CLSI, 2017a) e M27 - 4rd (CLSI, 2017b), mas com modificações, na qual o RPMI-1640 foi suplementado com sorbitol e ergosterol. O inóculo também foi preparado seguindo as mesmas etapas do método de microdiluição (seção 5.4), sendo selecionadas para os ensaios as linhagens de dermatófitos TRCBS, TMATCC, MCATCC e EF6069, e as cepas de referência ATCC de *C. glabrata* e CBS *de C. auris.*

No teste com sorbitol, o RPMI-1640 foi suplementado com sorbitol (PM = 182,17) a 0,8 M. Na preparação da placa 0,1 mL do meio suplementado foi distribuído nos poços para a diluição do composto nas concentrações 250 µg/mL a 0,97 µg/mL nos ensaios para dermatófitos e 2.000 µg/mL a 7,81 µg/mL para leveduras. Adicionalmente, 0,1 mL do inóculo foi distribuído nos poços. Para controle foi utilizado o meio RPMI-1640 sem suplementação para as mesmas concentrações. Na ausência do sorbitol, caso o composto atue sob a parede celular fúngica provocará a lise da célula, mas na presença desse protetor osmótico a célula permanecerá íntegra possibilitando o crescimento fúngico.

Para avaliação da interação com o ergosterol das células fúngicas, o composto e as linhagens fúngicas foram testados na presença do ergosterol exógeno com

suplementação do meio RPMI com 400 µg/mL de ergosterol, seguindo a mesma forma da preparação das placas do ensaio de sorbitol, sendo também utilizado o teste com RPMI-1640 sem suplementação para controle do teste. Caso a atividade do composto estiver relacionada com a interação ao ergosterol, ocorrerá a ligação com o ergosterol exógeno o que impedirá a plena ligação ao ergosterol da membrana fúngica e como consequência a CIM do composto tende a aumentar em relação ao ensaio controle.

Os ensaios ainda contaram com controle de crescimento, controle de esterilidade e controle do solvente DMSO utilizado na solubilização do composto, e para controle dos meios suplementados, o mesmo procedimento foi conduzido com os fármacos caspofungina e anfotericina B, em intervalos de concentração de 16 a 0,06 µg/mL, cujo mecanismo de ação envolve a interação com parede e membrana celular fúngica, respectivamente. Os valores das CIM do composto foram comparados na ausência e na presença do sorbitol e ergosterol exógeno. Os ensaios foram realizados em triplicata.

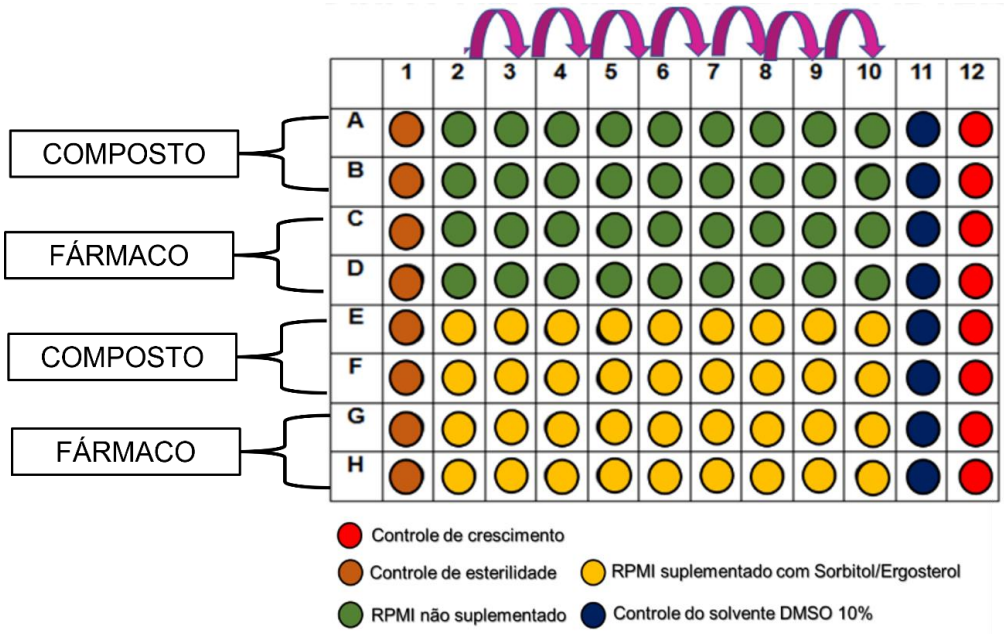

Figura 9. Layout do ensaio de ergosterol e sorbitol para avaliação da ação do composto na membrana citoplasmática e parede celular fúngica.

5.7 Ensaio de cinética de morte - Time kill

Ensaio da cinética de morte foi conduzido de acordo com método descrito por Klepser et al. (1998). O inóculo foi preparado seguindo as mesmas etapas do método de microdiluição (seção 5.4), sendo selecionadas para o ensaio as linhagens de

dermatófitos TRCBS, TMATCC, MCATCC e EF6069, e as cepas de referência ATCC de *C. glabrata* e CBS *de C. auris.*

Após a preparação dos inóculos, foi realizada uma diluição 1:1 com o composto, utilizando 0,2 mL do composto e 0,2 mL do inóculo. As concentrações do composto para este ensaio foram baseadas no valor da CIM, na qual foi utilizado, no mínimo, uma concentração duas vezes maior do valor da CIM. O composto foi preparado em duas concentrações para o ensaio em dermatófitos, uma a 500 µg/mL e outra a 62,5 µg/mL, e testadas separadamente. Nos testes para as espécies de candidas foi utilizado o composto em concentração de 4.000 µg/mL. O inóculo sem a presença do composto foi utilizado como controle de crescimento.

Em tempos predeterminados: momento inicial (0'), 8 horas, 24 horas, 48 horas e 120 horas, uma alíquota de 30 µl foi retirada de cada preparação teste (inóculo associado ao composto) e do controle (inóculo puro), e semeada em placas de ASD com auxílio de alça Drigalski, na qual foram incubadas a 35 °C.

As culturas foram analisadas, para contagem de colônias, após um período de crescimento de 120 horas para os dermatófitos e 48 horas para as leveduras. Posteriormente à contagem do número de colônias, os resultados foram ajustados em UFC/mL e estes por sua vez foram convertidos em valores de $\log_{10}$.

5.8 Ensaio de toxicidade com *Galleria mellonella*

O ensaio de toxicidade dos compostos foi realizado em larvas do modelo experimental de toxicidade *G. mellonella* de acordo com protocolo descrito por Ignasiak e Maxwell (2017). Para cada condição, foram separados 5 grupos com 5 larvas de *G. mellonella* (250 ± 25 mg) no sexto estágio de desenvolvimento em placas de Petri (90x15 mm) para inoculação de cada concentração do composto. O composto foi preparado nas concentrações de 125 mg/Kg, 250 mg/Kg, 500 mg/Kg, 1.000 mg/Kg e 2.000 mg/Kg, que correspondem, respectivamente, os valores de CIM 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1.000 µg/mL e 2.000 µg/mL. O volume de 5 µl foi injetado na última pró-pata direita das larvas utilizando micro seringa de Hamilton modelo 7000.5KH de 10 µl. Os controles do experimento foram larvas intocadas (naïve), larvas inoculadas com 99,9% etanol (controle de mortalidade), água estéril (controle negativo de toxicidade) e controle do DMSO 60%.

As larvas foram incubadas a 37°C, privadas de alimentação e iluminação direta. Foram feitas avaliações da sobrevivência das larvas a cada 24 horas durante 5 dias e retiradas diariamente as formações de pré-pupas para retardar sua metamorfose. A análise de sobrevida foi realizada e interpretada usando o teste log-rank (Mantel-Cox). O software GraphPad Prism versão 9.3.0 para Windows (San Diego, Califórnia, EUA) foi empregado para a análise estatística.

6 RESULTADOS

6.1 Triagem dos compostos derivados de chalconas

Seis compostos derivados de chalconas foram utilizados nos ensaios iniciais de triagem para verificação de atividade antifúngica através da técnica de microdiluição. Com base na CIM apresentada pelos compostos, a melhor ação contra os dermatófitos foi demonstrada pelo produto VS02 - 4'etil (7,81 - 15,62 µg/mL), na qual também apresentou atividade inibitória contra *C. glabrata* (250 µg/mL). Os valores de CIM e CFM obtidos pelos compostos derivados de chalconas estão descritos na tabela 2 para os dermatófitos e tabela 3 para as leveduras.

Devido aos impasses relacionados à produção e disponibilidade dos compostos em quantidades adequadas para as análises estabelecidas, somada a melhor atuação da atividade antifúngica, o composto VS02 - 4'etil foi selecionado para a continuidade dos ensaios laboratoriais, e os resultados obtidos estão relatados no artigo científico (Capítulo 2).

Tabela 2. Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) dos compostos derivados de chalconas testados contra *T. rubrum* e *T. mentagrophytes.*

COMPOSTOS	***Trichophyton rubrum***		***Trichophyton mentagrophytes***	
	CIM (µg/mL)	**CFM (µg/mL)**	**CIM (µg/mL)**	**CFM (µg/mL)**
RL - 3'OCH3	15,62	31,25	15,62	31,25
MM17- 3'Br	15,62	31,25	31,25	62,50
MM01 - 4'H	15,62	62,50	31,25	62,50
RL - 3'OH	125	250	125	250
RL01-4CH3	31,25	31,25	31,25	62,50
VS02 - 4'etil	7,81	31,25	15,62	31,25

Tabela 3. Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) dos compostos testados contra as leveduras *C. albicans, C. parapsilosis, C. glabrata, C. auris.*

COMPOSTOS	*C.albicans*		*C. parapsilosis*		*C. glabrata*		*C. auris*	
	CIM (µg/mL)	**CFM** (µg/mL)	**CIM** (µg/mL)	**CFM** (µg/mL)	**CIM** (µg/mL)	**CFM** (µg/mL)	**CIM** (µg/mL)	**CFM** (µg/mL)
RL - 3'OCH3	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
MM 17 - 3'Br	>250	>250	>250	>250	250	>250	>250	>250
MM01 - 4'H	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
RL - 3'OH	>250	>250	>250	>250	250	>250	>250	>250
RL01-4CH3	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
VS01-4etil	>250	>250	>250	>250	250	>250	>250	>250

6.2 Artigo original: Synergistic activity between conventional antifungals and chalcone-derived compound against dermatophyte fungi and *Candida* spp.

Taiza Maschio-Lima[1]. ORCID 0000-0001-6744-2784
Thiago Henrique Lemes[1]. ORCID 0000-0002-7906-1337
Mariela Domiciano Ribeiro Marques[2]. ORCID 0000-0002-7381-4545
João Paulo Zen Siqueira[2]. ORCID 0000-0002-5807-9204
Bianca Gottardo de Almeida[3]. ORCID 0000-0001-7751-0752
Glaucia Rigotto Caruso[4]. ORCID 0000-0002-0554-5726
Marcia Regina von Zeska Kress[4]. ORCID 0000-0003-1239-7722
Paulo de Tarso da Costa[1]. ORCID 0000-0002-3598-5183
Luis Octávio Regasini[5]. ORCID 0000-0002-3705-0971
Margarete Teresa Gottardo de Almeida[2]. ORCID 0000-0002-8665-9126

1. Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences, São Paulo State University (UNESP). São José do Rio Preto (São Paulo), Brazil.
2. Department of Dermatological, Infectious, and Parasitic Diseases, School of Medicine São José Do Rio Preto (FAMERP). São José do Rio Preto (São Paulo), Brazil.
3. Embrapa Instrumentation. São Paulo, Brazil.
4. School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP). Ribeirão Preto (São Paulo), Brazil.
5. Laboratory of Antibiotics and Chemotherapy. Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences, São Paulo State University (UNESP). São José do Rio Preto (São Paulo), Brazil.

Abstract

The scarce antifungal arsenal, changes in the susceptibility profile of fungal agents, and lack of adherence to treatment have contributed to the increase of cases of dermatomycoses. In this context, new antimicrobial substances have gained importance. Chalcones are precursors of the flavonoid family that have multiple biological activities, have high tolerability by humans, and easy synthesis. In this study, we evaluated the in vitro antifungal activity, alone and in combination with conventional antifungal drugs, of the VS02–4'ethyl chalcone-derived compound against dermatophytes and *Candida* spp. Susceptibility testing was carried out by broth microdilution. Experiments for determination of the target of the compound on the fungal cell, time-kill kinetics, and toxicity tests in *Galleria mellonella* model were also performed. Combinatory effects were evaluated by the checkerboard method. Results showed high activity of the compound VS02–4'ethyl against dermatophytes (MIC of 7.81–31.25 µg/ml). The compound targeted the cell membrane, and the time-kill test showed the compound continues to exert gradual activity after 5 days on dermatophytes, but no significant activity on *Candida*. Low toxicity was observed at 250 mg/kg. Excellent results were observed in the combinatory test, where VS02–4'ethyl showed synergistic interactions with itraconazole, fluconazole, terbinafine, and griseofulvin, against all isolates tested. Although further investigation is needed, these results revealed the great potential of chalcone-derived compounds against fungal infections for which treatments are long and laborious.

Keywords: Chalcones, Antifungal activity, Synergistic interaction, Dermatomycoses, Dermatophytes, *Candida*.

Acknowledgements This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001. Authors would like to thank the Laboratory of Microbiology of the São José do Rio Preto School of Medicine (FAMERP), and the Laboratory of Antibiotics and Chemotherapeutics of the São Paulo State University (Unesp), Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences, São José do Rio Preto, Brazil.

Introduction

Dermatomycoses affect 20–25% of the world population (Baghi et al. 2016; Zhan and Liu 2017; Appelt et al. 2021). They are caused by fungi that can invade the stratum corneum the skin, the intrafollicular keratinized portion of the hair, or nail plate (Corralo et al. 2014). The main etiological agents are dermatophyte fungi, especially *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum*, and *Microsporum canis*; and *Candida* spp. (Monod and Méhul 2019; Sylla et al. 2019). The scarce antifungal arsenal and change in the susceptibility profile of the etiological agents have contributed to the perpetuation of these mycoses in the population.

Furthermore, patients often fail to adhere to long-term treatments (Gupta and Stec 2019; Lindsø Andersen et al. 2020; Gupta et al. 2021).

In the search of new antimicrobial molecules, plant metabolites are being increasingly studied due to their beneficial biological properties (Dos Santos Ramos et al. 2016). In this context, chalcones, precursors of the flavonoid family, have great potential for exploration. They can interact with multiple biological targets, have high tolerability by humans, and the synthesis of its derivatives is simple (León-González et al. 2015). It has been reported many chemotherapeutic activities, including anticancer (Letafat et al. 2013; Ketabforoosh et al. 2014), antibacterial (Nowakowska 2007; Mahapatra et al 2015; Marques et al 2020), antiviral (Duran et al 2021; Mothana et al 2022; Valipour 2022), and antifungal (Wang et al. 2016; Marques et al 2020; Mirzaei et al. 2020; Gładkowski et al. 2023).

In this study, we report the activity of a chalcone-derived compound, including determination of the target on the fungal cell, time-kill and toxicity analyses, and synergistic activity with conventional antifungals, against dermatophytes and *Candida* spp.

Material and Methods

Fungal isolates

The list of clinical isolates and reference strains used in this study is in Table 1. In accordance with the Brazilian regulation, the isolates are registered in the SisGen (National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge) – protocol number A2B1006.

Table 1. Dermatophytes and *Candida* isolates included in this study, the identification code, culture collection and origin of isolation.

Isolate code	Species	Culture collection	Origin
TRCBS	*T. rubrum*	CBS2266	-
TR7984	*T. rubrum*	FAMERP	foot skin
TR6284	*T. rubrum*	FAMERP	toenail
TMATCC	*T. mentagrophytes*	ATCC 18748	mild dermatophytosis
TM6007	*T. mentagrophytes*	FAMERP	foot skin
TM6085	*T. mentagrophytes*	FAMERP	toenail
MCATCC	*M. canis*	ATCC 11621	clinical dermatophytosis

MC8168	*M. canis*	FAMERP	scalp
MC8295	*M. canis*	FAMERP	scalp
EF6050	*E. floccosum*	FAMERP	toenail
EF6069	*E. floccosum*	FAMERP	toenail
EF8233	*E. floccosum*	FAMERP	toenail
CGATCC	*C. glabrata*	ATCC 2001	feces
CG6930	*C. glabrata*	FAMERP	urine
CAUCBS	*C. auris*	CBS	-
CAU491	*C. auris*	FAMERP	-

ATCC: American Type Culture Collection; CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures; FAMERP: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; (-): unknown.

Synthesis of the compound

The chalcone-derived compound was provided by the Laboratory of Antibiotics and Chemotherapy (LAQ) at the São Paulo State University (Unesp), Campus São José do Rio Preto, Brazil. It was synthesized by Claisen–Schmidt aldol condensation reaction (Dos Santos et al. 2017; Dos Santos et al. 2019). The components (aminoacetophenones and aldehydes) were dissolved in ethanol, and sodium hydroxide in ethanol was added as catalyst solution. The reaction product was kept under stirring for 2–6 hours at RT and then poured into ice and filtered or extracted with ethyl acetate. The organic phases were combined and washed with aqueous NaHSO solution and dried over $MgSO_4$. Filtration occurred under reduced pressure. After chromatographic separation and purification, the chalcone compounds were obtained in a yield of around 40%. Characterization of compounds included determination of melting points, structure, and spectral analyses. The compound used in this study was the VS02–4'ethyl, where an ethyl group was inserted at the fourth carbon position of the first aromatic ring (Figure 1). For the in vitro assays, the compound was solubilized in 10% DMSO (LabSynth®).

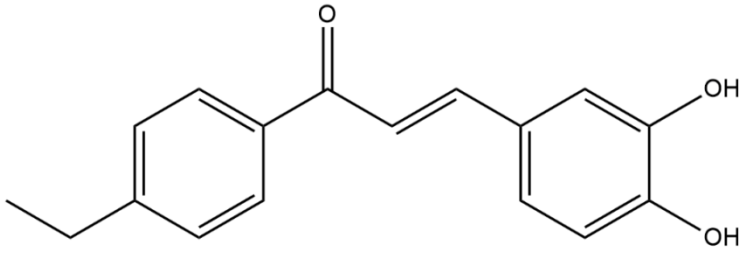

Figure 1. Chemical structure of the chalcone-derived compound VS02–4'ethyl.

Antifungal susceptibility testing

The susceptibility profiles of the fungal isolates against the VS02–4'ethyl chalcone compound and conventional antifungal drugs (itraconazole, fluconazole, terbinafine, griseofulvin – [Sigma-Aldrich®]) were determined by broth microdilution, according to protocols M38-3rd ed (CLSI 2017a) and M27-4th ed (CLSI 2017 b) of the Clinical Laboratory Standard Institute

In 96-wells plates, the VS02–4'ethyl was serially diluted in RPMI–1640 medium (Rosen Park Media Institute – Sigma-Aldrich®). For dermatophytes, final testing concentrations ranged from 250 to 0.48 µg/ml. For yeast, the concentrations ranged from 1,000–1.95 µg/ml. Similarly, the antifungals were diluted to reach the following concentrations: 256–0.5 µg/ml, for fluconazole; 8–0.015 µg/ml, for terbinafine; and 16–0.03 µg/ml, for itraconazole and griseofulvin. Griseofulvin was only tested against dermatophytes.

Dermatophytes were cultured in Potato-dextrose agar (Oxoid ®) for 7 days, at 35ºC, and yeast in Sabouraud-dextrose agar (SDA - Oxoid ®) for 24 hours, at 37ºC. The inoculums were prepared in 0.9% sterile saline solution to reach final concentrations of 0.4 to 5 x 10^4 CFU/ml, for dermatophytes, and 0.5 to 2.5 x 10^3 CFU/ml, for yeast.

After inoculation, the plates were incubated at 35ºC and visual readings were carried out after 120 hours, for dermatophytes, and 48 hours, for yeast. Minimum inhibitory concentrations (MIC) were determined as the lowest concentration capable of inhibiting 80% of fungal growth, for fluconazole and itraconazole, and 100% of fungal growth, for griseofulvin, terbinafine, and the VS02–4'ethyl compound.

Minimum fungicidal concentrations (MFC) were determined by subculturing an aliquot from each well into agar plates, and it was considered as the lowest concentration capable of inhibiting fungal growth in the culture medium.

Sterility, growth, and solvent controls were added to each test. Tests were performed in triplicate.

Sorbitol and ergosterol assays

In addition to the compound susceptibility testing, experiments were performed with two different supplemented RPMI–1640 to determine where the VS02–4'ethyl will target on the fungal cell. The first supplement to the RPMI–1640 medium was 0.8 M sorbitol (Sigma-Aldrich®) (De Castro et al. 2015). Sorbitol acts as an osmoprotector

that allows cells to grow in the presence of an inhibitor of a fungal cell wall synthesis (Svetaz et al. 2007). Consequently, increases in MIC values indicates that the compound targets the cell wall. The other supplement was the ergosterol (Sigma-Aldrich®) at 400 µg/ml (De Castro et al. 2015). If the compound activity is due to ergosterol binding, providing exogenous ergosterol would prevent binding to ergosterol of the fungal membrane, what would increase MIC values (Escalante et al. 2008).

The fungal isolates TRCBS, TMATCC, MCATCC, EF6069, CGATCC, and CAUCBS were selected for these assays. Values of MIC were compared with and without sorbitol and ergosterol supplementation.

As controls, these isolates were tested against caspofungin (Sigma-Aldrich®) and amphotericin B (Sigma-Aldrich®) (at final concentration of 16 to 0.03 µg/ml) with RPMI–1640 without and with supplementation with sorbitol and ergosterol, respectively. Sterility, growth, and solvent controls were added to each test. Tests were performed in triplicate.

Time-kill analysis

Time kill analysis were carried out according to Klepser et al. (1998). The isolates used in this experiment were TRCBS, TMATCC, MCATCC, EF6069, CGATCC, and CAUCBS. Fungal inoculums were prepared as previously described and diluted 1:1 with VS02–4'ethyl. For dermatophytes, two concentrations of the compound were tested, 500 µg/ml and 62.5 µg/ml. For *Candida* spp., the concentration of the compound was 4000 µg/ml. Controls included 10% DMSO solution, without the compound.

At predetermined times (initial moment – 0 h, 8 h, 24 h, 48 h and 120 h), an aliquot of 30 µl was inoculated on SDA plates with a Drigalski spatula. After 120 h, for dermatophytes, and 48 h, for yeasts, at 35ºC, the colonies were counted, and the results adjusted to Log_{10} CFU/ml.

Toxicity analysis

The toxicity of the VS02–4'ethyl compound was determined by an experimental model of *Galleria mellonella* larvae, according to Ignasiak & Maxwell (2017). The compound was tested at the following concentrations: 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1,000 µg/ml, and 2,000 µg/ml). For each experiment, 5 groups of 5 larvae at the sixth stage of development (250 ± 25 mg) were inoculated with compound. Five µl was

injected into the last right proleg of the larvae using a 10 µl Hamilton model 7000.5KH micro syringe. As controls, it was used untouched larvae (naïve), larvae inoculated with 99.9% ethanol (mortality control), sterile water (negative toxicity control) and 60% DMSO.

The larvae were incubated at 37°C, deprived of food and direct lighting. Larvae survival assessments were carried out every 24 hours for 5 days and pre-pupal formations were removed daily to delay their metamorphosis. Survival analysis was performed using the log-rank (Mantel-Cox) test. GraphPad Prism® software version 9.3.0 for Windows (San Diego, California, USA) was used for statistical analysis.

Checkerboard assay

The combinatorial effect between the chalcone-derived compound and conventional antifungal drugs was evaluated using the checkerboard method (CLSI 2017b; Lemes et al. 2023).

In 96-wells plates, the VS02–4'ethyl was combined with each antifungal. In the assays against dermatophytes, the chalcone-derived compound concentration ranged from 125–0.12 µg/ml, and, for *Candida* spp., ranged from 1,000–0.97 µg/ml. The antifungal drugs varied from: 128–0.5 µg/ml, for fluconazole; 16–0.03, for itraconazole; 64–0.007 µg/ml, for terbinafine; and 4–0.06 µg/ml, for griseofulvin. Griseofulvin was only tested against dermatophytes.

The isolates TRCBS, TR7984, CGATCC, and CAUCBS were used in this assay. The inoculums were prepared as previously described. Inoculation, incubation, and readings were also performed as previously described.

To evaluate the interaction between the compound and the drugs, the Fractional Inhibitory Concentration (FIC) index was calculated, following the classification by Kumar et. al (2012), where: FIC ≤ 0.5 means synergistic interaction; 0.5 < FIC ≤ 1 means additive action; 1 < FIC ≤ 2 means indifferent interaction; and FIC > 2 means antagonistic interaction.

Results

Antifungal activity of VS02–4'ethyl

The chalcone-derived compound showed high activity against dermatophytes, with MIC ranging from 7.81–31.25 µg/ml, and geometric mean (GM) of 14.74 µg/ml.

For *Candida* spp., MIC values ranged from 500–1000 µg/ml and GM of 840.90 µg/ml. Regarding MFC, values varied between 31.25–>250 µg/ml, for dermatophytes, and 1,000–>1,000 µg/ml, for *Candida* spp. (Table 2).

Regarding the antifungal drugs, terbinafine showed the most potent activity against dermatophytes (Table 2); followed by itraconazole and griseofulvin. Fluconazole showed the least activity. Against *Candida* isolates, only itraconazole exhibited high activity. Detailed results are shown in Table 2.

Table 2. Minimum inhibitory concentrations (MIC), minimum fungicidal concentrations (MFC), and geometric mean MIC values of the chalcone-derived compound; and MIC values of fluconazole, itraconazole, terbinafine, and griseofulvin, against the isolates of *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis*, *E. floccosum*, *C. glabrata*, and *C. auris* included in this study.

Isolates	VS02–4'ethyl		Fluconazole	Itraconazole	Terbinafine	Griseofulvin
	MIC (µg/ml)	MFC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MIC (µg/ml)
T. rubrum						
TRCBS	15.62	31.25	4	0.5	<0.015	1
TR6284	7.81	31.25	32	0.25	<0.015	1
TR7984	7.81	31.25	32	0.12	<0.015	1
GM	9.84					
T. mentagrophytes						
TMATCC	31.25	>250	4	0.5	<0.015	0.5
TM6007	7.81	31.25	128	0.5	<0.015	0.5
TM6085	15.62	62.50	128	0.12	<0.015	1
GM	15.62					
M. canis						
MCATCC	15.62	62.50	16	0.25	<0.015	0.06
MC8168	15.62	250	32	0.25	<0.015	0.25
MC8295	15.62	250	32	0.12	<0.015	0.5
GM	15.62					
E. floccosum						
EF6050	31.25	250	8	0.12	0.5	2
EF6069	15.62	125	32	0.12	<0.015	0.5
EF8233	15.62	62,50	32	0.12	<0.015	2
GM	19.68					
C. glabrata						
CGATCC	500	1000	32	2	16	-
CG6930	1000	>1000	32	2	16	-
GM	707.11					
C. auris						
CAUCBS	1000	>1000	8	0.06	2	-
CAU491	1000	>1000	>128	0.25	>16	-
GM	1000					

MIC: minimum inhibitory concentration; MFC: minimum fungicidal concentration; GM: geometrical mean.

Sorbitol and ergosterol assays

Comparing of the experiments with and without supplementation, it was observed that the presence of sorbitol did not alter the MIC values. However, the presence of exogenous ergosterol in the tests caused the MIC values to increase up to 8 times (from 31.25 to 250 µg/ml) (Table 3). That indicates that the VS02–4'ethyl targets the cell membrane of fungi.

Table 3. Sorbitol and ergosterol supplementation tests. Minimum inhibitory concentration (MIC) values (in µg/ml) of the VS02–4'ethyl chalcone-derived compound, caspofungin, and amphotericin B, before and after medium supplementation with sorbitol or ergosterol, against *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis*, *E. floccosum*, *C. glabrata*, and *C. auris* isolates.

Isolate	Sorbitol supplementation				Ergosterol supplementation			
	MIC Before		MIC After		MIC Before		MIC After	
	VS	CSP	VS	CSP	VS	AMB	VS	AMB
TRCBS	31,25	0,12	31,25	0,5	31,25	0,5	250	2
TMATCC	31,25	0,03	31,25	0,06	31,25	0,25	250	8
MCATCC	7,81	0,12	7,81	0,25	15,62	0,12	125	0,5
EF6050	62,5	0,06	62,5	0,25	31,25	0,25	250	0,5
CGATCC	500	4	500	8	500	16	>2.000	>16
CAUCBS	1.000	16	1.000	>16	1.000	8	>2.000	>16

VS: VS02–4'ethyl chalcone-derived compound; CSP: caspofungin; AMB: amphotericin B.

Time-kill analysis

Data obtained in the time-kill experiments can be seen on Figure 2. For dermatophytes, results show that the compound caused a mean of 1.12-log reduction of viability, at 500 µg/ml, and 0.92-log reduction, at 62.5 µg/ml, after five days. The figure shows that the decrease was gradual over time, until the end of the analysis. Contrarily, the analyses evidenced that the compound does not have high activity against the *Candida* isolates tested, since no reduction could be observed after five days, even at a higher concentration of the compound (4.000 µg/ml).

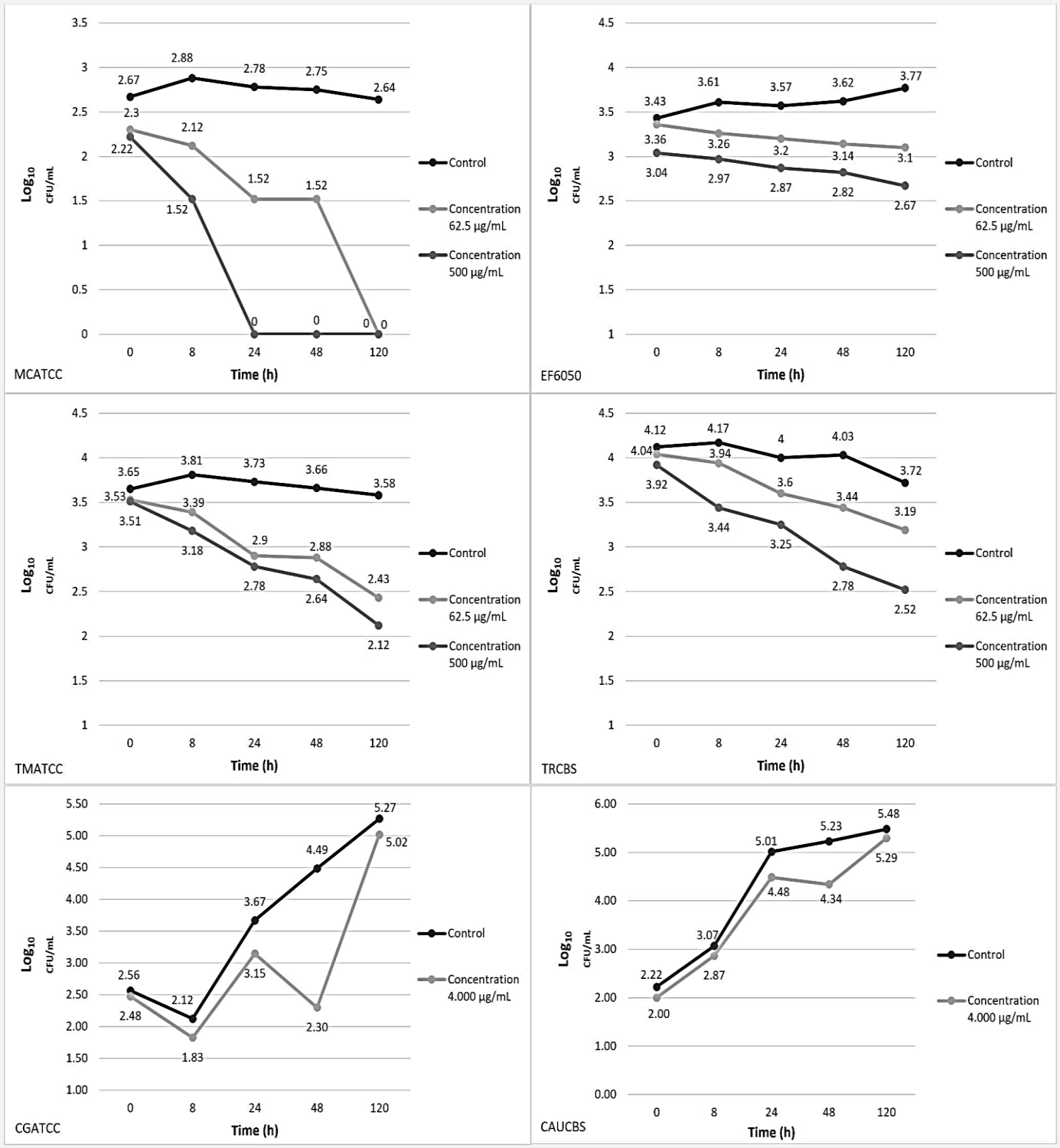

Figure 2. Time-kill kinetics assay. Log10 CFU/ml after 0, 8, 24, 48, and 120 hours.

Toxicity analysis

The tests with VS02–4'ethyl concentration of 125 mg/kg and 250 mg/kg showed low toxicity, with survival rates of 60% of the *G. mellonella* larvae, after five days. At 500 mg/kg, 40% of the larvae survived after five days. Concentrations of 1,000 and 2,000 mg/kg of VS02–4'ethyl killed all larvae after three and four days, respectively (Figure 3).

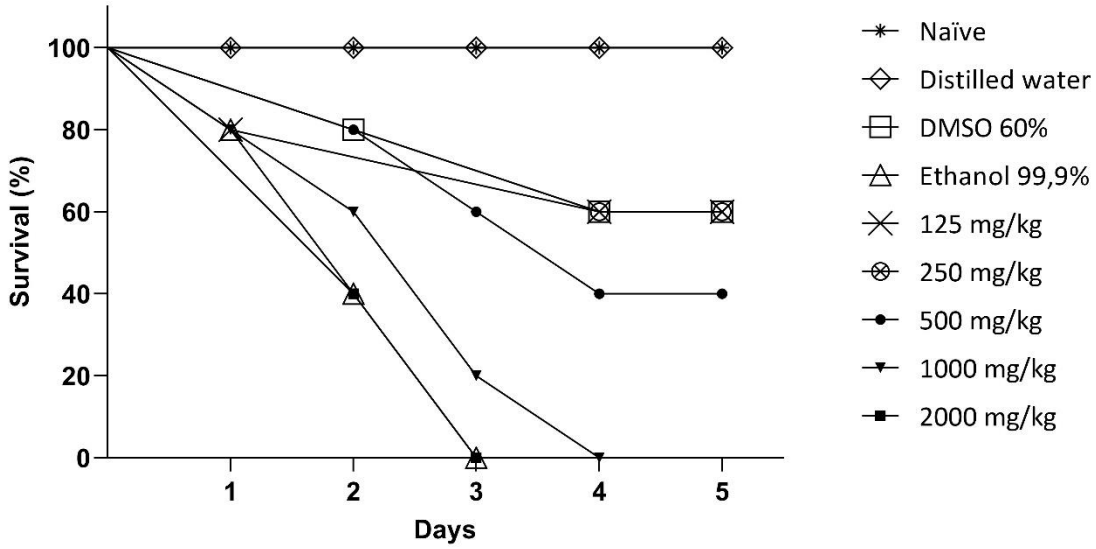

Figure 3. Survival rate (%) of *G. mellonella* larvae exposed to different concentrations of the VS02–4'ethyl chalcone-derived compound, and distilled water, 60% DMSO, 99.9% ethanol.

Checkerboard assay

When combined, all tests showed MIC reduction of the antifungal drugs and the VS02–4'ethyl compound. Values of FIC index varied from 0.1 to 0.5, all in the range of synergistic combinatory effect (Table 4).

Table 4. Checkerboard assays results. Minimum inhibitory concentration (MIC) values (in µg/ml) of the VS02–4'ethyl chalcone-derived compound and fluconazole, itraconazole, griseofulvin, and terbinafine, alone and combined, against *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *C. glabrata*, and *C. auris* isolates; and fractional inhibitory concentration index (FICI), which indicates the nature of the combinatory effect of the compounds.

Isolate	Single agent MIC		In combination MIC		FICI	Combinatory effect
	VS	FCZ	VS	FCZ		
TRCBS	31.25	4	0.12	2	0.5	Synergistic
TR7984	15.62	32	0.12	16	0.5	Synergistic
CGATCC	1000	64	0.97	16	0.2	Synergistic
CAUCBS	1000	32	0.97	16	0.5	Synergistic
	VS	ITZ	VS	ITZ		
TRCBS	31.25	0.5	0.12	0.16	0.3	Synergistic
TR7984	15.62	0.5	0.12	0.25	0.5	Synergistic
CGATCC	1000	16	0.97	2	0.1	Synergistic
CAUCBS	1000	0.5	0.97	0.25	0.5	Synergistic
	VS	TBF	VS	TBF		
TRCBS	31.25	0.007	0.12	0.003	0.4	Synergistic
TR7984	15.62	0.015	0.12	0.007	0.4	Synergistic
CGATCC	1000	64	250	2	0.2	Synergistic
CAUCBS	1000	64	250	8	0.3	Synergistic
	VS	GFV	VS	GFV		
TRCBS	31.25	1	0.12	0.5	0.4	Synergistic
TR7984	15.62	1	0.12	0.5	0.5	Synergistic

MIC: minimum inhibitory concentration; VS: VS02–4'ethyl chalcone-derived compound; FCZ: fluconazole; ITZ: itraconazole; TBF: terbinafine; GFV: griseofulvin; FICI: fractional inhibitory concentration index.

Discussion

In this study, we report the antifungal activity of the chalcone-derived compound VS02–4'ethyl against the main etiological agents of dermatomycoses. Chalcones are among the main secondary metabolites of edible plants. Most chalcones are polyhydroxylated aromatic compounds and bioprecursors of open-chain flavonoids and isoflavonoids (Rudrapal et al. 2021). They can be obtained from natural or synthetic sources, which can form different derivative compounds from their main structure (Mirzaei et al. 2020). Due to the presence of phenolic groups and their property of scavenging radicals, plant extracts rich in chalcones have been extensively studied in the search for new therapeutic compounds (Ouyang et al. 2021).

Regarding their antimicrobial activity, it has been reported that chalcones and other flavonoids are lipophilic, which may lead to disruption of the cell membrane and leakage of nucleic acids (Thebti et al. 2023), which corroborates the data obtained in the ergosterol experiment of this study. Additionally, the activity of a chalcone-derived compounds may result from the downregulation of genes encoding virulence factors, such as isocitrate lyase, citrate synthase and malate synthase (Cantelli et al. 2017), or

efflux pumps (Komoto et al. 2015). However, chalcones may act differently depending on the fungal species or genera (Lahtchev et al. 2008; Mellado et al. 2020; Morão et al. 2020).

The VS02–4'ethyl compound showed higher activity against dermatophytes when compared to *Candida* isolates (Table 2). A previous study showed that yeast's intracellular glutathione and cysteine molecules act as defense barriers against chalcones (Lahtchev et al. 2008). These proteins are related to vitality, cellular development, and pathogenesis (Wangsanut and Pongpom 2022). In a metabolomic study by Ciesielska et al. (2021), the authors report that, during keratin degradation by dermatophytes, cysteine levels increased but glutathione molecules were not detected in the experiment. This glutathione deficiency may help elucidate why the VS02–4'ethyl presented higher activity against dermatophytes.

It is crucial the discovery and development of new treatments for dermatomycoses because of their great incidence worldwide. Moreover, treatment failure and antifungal resistance are being increasingly reported (Gupta and Venkataraman 2022). Antifungal resistance is often related to mutations that modifies the target of the drug or regulation of efflux pumps (Ksiezopolska and Gabaldón 2018) and can be associated to long term use. A 2-year study demonstrated that excessive use of fluconazole promoted resistance in *Candida* species, with approximately 98% of the *C. albicans* isolates, 93% of *C. parapsilosis*, 91% of *C. tropicalis*, and 68% of *C. glabrata* resistant to fluconazole (Beardsley et al. 2018). *Candida auris*, although is not a common agent of superficial mycoses, colonizes the skin and it was included in this study due to the high incidence of resistance to multiple classes of antifungals and growing concern about outbreaks (Spivak and Hanson 2018).

Regarding dermatophytes, it is estimated that 19% of infections are caused by azole-resistant strains (Ghannoum 2016). Although resistance to azoles is more likely, resistance to terbinafine has also been reported in *Microsporum* spp. and *Trichophyton* spp. and is associated with mutations in genes encoding the enzyme squalene epoxidase (Lindsø Andersen et al. 2020; Gupta et al. 2021). Failures in treatment may still be associated with insufficient dose and duration regimes, in addition to low patient adherence (Gupta and Venkataraman 2022).

In this study, we highlight the antifungal activity of the VS02–4'ethyl chalcone-derived compound in association with the conventional antifungal drugs (Table 4). Synergistic interaction occurred in all experiments, causing a significant decrease of

MIC values for both antifungal and the compound itself. This may be incredibly beneficial, especially against *C. glabrata* and *C. auris*, which presented elevated MIC values for the compound and the antifungals alone. Synergistic interactions can improve drug pharmacokinetics, slow down their metabolism and elimination by the body, and decrease toxicity effects (Ahmad et al. 2017). Different possible mechanisms for synergy activities have already been proposed: one compound may act alone and the second bind to the target, facilitating the binding of the first compound; two compounds may reach different locations or biological pathways and exert a collective effect; or two compounds can act on the same biological pathway at two different stages, increasing activity (Ahmad et al. 2017; Spitzer et al. 2017).

Synergistic interactions between chalcone-derived compounds and fluconazole have already been reported. Ahmad et al. (2017) investigation indicated that the chalcone-fluconazole interaction reversed fluconazole resistance causing a downregulation of the ERG11 gene, which is important in the ergosterol biosynthesis pathway and is crucial for fluconazole resistance. Nonetheless, this may not be the only mode of action, since the VS02–4'ethyl also showed synergy with griseofulvin, which acts in the process of fungal mitosis by interacting with microtubules, disrupting the mitotic spindle (Yesudian et al. 2021). Unfortunately, most data available on the interaction of antifungal drugs and chalcone-derived compounds reference fluconazole.

In conclusion, the main finding of this study was the highly synergistic activity of VS02–4'ethyl chalcone-derived compound with conventional antifungal drugs against dermatophytes and *Candida* spp. Further investigations are needed to elucidate the mode of action and the synergistic interaction of the VS02–4'ethyl with the different classes of antifungals. In addition, further studies should reveal the best administration route and the in vivo effects of the compound. Nevertheless, these results revealed the great potential of chalcone-derived compounds against fungal infections for which treatments are long and laborious.

References

Ahmad A, Wani MY, Patel M, Sobral AJFN, Duse AG, Aqlan FM, Al-Bogami AS (2017). Synergistic antifungal effect of cyclized chalcone derivatives and fluconazole against *Candida albicans*. Medchemcomm 8:2195-2207. https://doi.org/10.1039/c7md00440k

Appelt L, Nenoff P, Uhrlaß S, Krüger C, Kühn P, Eichhorn K, Buder S, Beissert S, Abraham S, Aschoff R, Bauer A (2021). Terbinafin-resistente Dermatophytosen und Onychomykose durch Trichophyton rubrum [Terbinafine-resistant dermatophytoses and onychomycosis due to Trichophyton rubrum]. Hautarzt 72:868-877. https://doi.org/10.1007/s00105-021-04879-1

Baghi N, Shokohi T, Badali H, Makimura K, Rezaei-Matehkolaei A, Abdollahi M, Didehdar M, Haghani I, Abastabar M (2016). In vitro activity of new azoles luliconazole and lanoconazole compared with ten other antifungal drugs against clinical dermatophyte isolates. Med Mycol 54(7):757-763. https://doi.org/10.1093/mmy/myw016

Beardsley J, Halliday CL, Chen SC, Sorrell TC (2018). Responding to the emergence of antifungal drug resistance: perspectives from the bench and the bedside. Future Microbiol 13(10). https://doi.org/10.2217/fmb-2018-0059

Cantelli BAM, Bitencourt TA, Komoto TT, Beleboni RO, Marins M, Fachin AL (2017). Caffeic acid and licochalcone A interfere with the glyoxylate cycle of *Trichophyton rubrum*. Biomed Pharmacother 16:1389-1394. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.051

Ciesielska A, Kawa A, Kanarek K, Soboń A, Szewczyk R (2021). Metabolomic analysis of *Trichophyton rubrum* and *Microsporum canis* during keratin degradation. Sci Rep 11(3959). https://doi.org/10.1038/s41598-021-83632-z

CLSI (2017a). M38-3rd ed. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard — Third Edition. Clinical and Laboratory Standard Institute.

CLSI (2017b). M27-4th ed. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Standard — 4th Edition. Clinical and Laboratory Standard Institute.

Corralo DS, Heras-Alonso ME, Acebes LO (2014). Infecciones cutáneas. Medicine 11(47):2755-2763. https://doi.org/10.1016/S0304-5412(14)70694-8

De Castro RD, de Souza TM, Bezerra LM, Ferreira GL, Costa EM, Cavalcanti AL (2015). Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin

against *Candida* species involved with infections in the oral cavity: an in vitro study. BMC Complement Altern Med 15(417). https://doi.org/10.1186/s12906-015-0947-2

Dos Santos Ramos MA, de Toledo LG, Calixto GM, Bonifácio BV, de Freitas Araújo MG, Dos Santos LC, de Almeida MT, Chorilli M, Bauab TM (2016). Syngonanthus nitens Bong. (Rhul.)-Loaded Nanostructured System for Vulvovaginal Candidiasis Treatment. Int J Mol Sci 17(8):1368. https://doi.org/10.3390/ijms17081368

Dos Santos MB, Pinhanelli VC, Garcia MAR, Silva G, Baek SJ, França SC, Fachin AL, Marins M, Regasini LO (2017). Antiproliferative and pro-apoptotic activities of 2'- and 4'-aminochalcones against tumor canine cells. Eur J Med Chem 29(138):884-889. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.049

Dos Santos MB, Bertholin Anselmo D, de Oliveira JG, Jardim-Perassi BV, Alves Monteiro D, Silva G, Gomes E, Lucia Fachin A, Marins M, de Campos Zuccari DAP, Octavio Regasini L (2019). Antiproliferative activity and p53 upregulation effects of chalcones on human breast cancer cells. J Enzyme Inhib Med Chem 34(1):1093-1099. https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1615485

Duran N, Polat MF, Aktas DA, Alagoz MA, Ay E, Cimen F, Tek E, Anil B, Burmaoglu S, Algul O (2021). New chalcone derivatives as effective against SARS-CoV-2 agent. Int J Clin Pract 75(12):e14846. https://doi.org/10.1111/ijcp.14846

Escalante A, Gattuso M, Pérez P, Zacchino S (2008). Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. J Nat Prod 71(10):1720-1725. https://doi.org/10.1021/np070660i

Ghannoum M (2016). Azole Resistance in Dermatophytes: Prevalence and Mechanism of Action. J Am Podiatr Med Assoc 106(1):79-86. https://doi.org/10.7547/14-109

Gładkowski W, Siepka M, Żarowska B, Białońska A, Gawdzik B, Urbaniak M, Wawrzeńczyk C (2023). Chalcone-Derived Lactones: Synthesis, Whole-Cell Biotransformation, and Evaluation of Their Antibacterial and Antifungal Activity. Molecules 28(9):3800. https://doi.org/10.3390/molecules28093800

Gupta AK, Stec N (2019). Recent advances in therapies for onychomycosis and its management. F1000Res 8(F1000 Faculty Rev):968. https://doi.org/10.12688/f1000research.18646.1

Gupta AK, Renaud HJ, Quinlan EM, Shear NH, Piguet V (2021). The Growing Problem of Antifungal Resistance in Onychomycosis and Other Superficial Mycoses. Am J Clin Dermatol 22:149-157. https://doi.org/10.1007/s40257-020-00580-6

Gupta AK, Venkataraman M (2022). Antifungal resistance in superficial mycoses. J Dermatolog Treat 33(4):1888-1895. https://doi.org/10.1080/09546634.2021.1942421

Ignasiak K, Maxwell A (2017). *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. BMC Res Notes 10(428). https://doi.org/10.1186/s13104-017-2757-8

Ketabforoosh SH, Kheirollahi A, Safavi M, Esmati N, Ardestani SK, Emami S, Firoozpour L, Shafiee A, Foroumadi A (2014). Synthesis and anti-cancer activity evaluation of new dimethoxylated chalcone and flavanone analogs. Arch Pharm (Weinheim) 347(11):853-860. https://doi.org/10.1002/ardp.201400215

Klepser ME, Ernst EJ, Lewis RE, Ernst ME, Pfaller MA (1998). Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. Antimicrob Agents Chemother 42(5). https://doi.org/10.1128/AAC.42.5.1207

Komoto TT, Bitencourt TA, Silva G, Beleboni RO, Marins M, Fachin AL (2015). Gene Expression Response of *Trichophyton rubrum* during Coculture on Keratinocytes Exposed to Antifungal Agents. Evid Based Complement Alternat Med 2015:180535. https://doi.org/10.1155/2015/180535

Ksiezopolska E, Gabaldón T (2018). Evolutionary Emergence of Drug Resistance in *Candida* Opportunistic Pathogens. Genes (Basel) 9(9):461. https://doi.org/10.3390/genes9090461

Kumar SN, Siji JV, Nambisan B, Mohandas C (2012). Activity and synergistic interactions of stilbenes and antibiotic combinations against bacteria in vitro. World J Microbiol Biotechnol 28(11):3143-3150. https://doi.org/10.1007/s11274-012-1124-0

Lahtchev KL, Batovska DI, Parushev SP, Ubiyvovk VM, Sibirny AA (2008). Antifungal activity of chalcones: a mechanistic study using various yeast strains. Eur J Med Chem 43(10):2220-2228. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.12.027

Lemes TH, Nascentes JAS, Regasini LO, Siqueira JPZ, Maschio-Lima T, Pattini VC, Ribeiro MD, de Almeida BG, de Almeida MTG (2023). Combinatorial effect of fluconazole, itraconazole, and terbinafine with different culture extracts of *Candida*

parapsilosis and *Trichophyton* spp. against *Trichophyton rubrum*. Int Microbiol https://doi.org/10.1007/s10123-023-00438-x

León-González AJ, Acero N, Muñoz-Mingarro D, Navarro I, Martín-Cordero C (2015). Chalcones as Promising Lead Compounds on Cancer Therapy. Curr Med Chem 22(30):3407-3425. https://doi.org/10.2174/0929867322666150729114829

Letafat B, Shakeri R, Emami S, Noushini S, Mohammadhosseini N, Shirkavand N, Kabudanian Ardestani S, Safavi M, Samadizadeh M, Letafat A, Sha Ee A, Foroumadi A (2013). Synthesis and in vitro cytotoxic activity of novel chalcone-like agents. Iran J Basic Med Sci 16(11):1155-1162.

Lindsø Andersen P, Jemec GB, Saunte DML (2020). Treatment adherence and psychosocial impact of tinea capitis in families: Qualitative pilot study. Dermatol Ther 33(4):e13570. https://doi.org/10.1111/dth.13570

Mahapatra DK, Bharti SK, Asati V (2015). Chalcone scaffolds as anti-infective agents: structural and molecular target perspectives. Eur J Med Chem 101:496-524. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.06.052

Marques BC, Santos MB, Anselmo DB, Monteiro DA, Gomes E, Saiki MFC, Rahal P, Rosalen PL, Sardi JCO, Regasini LO (2020). Methoxychalcones: Effect of Methoxyl Group on the Antifungal, Antibacterial and Antiproliferative Activities. Med Chem 16(7):881-891. https://doi.org/10.2174/1573406415666190724145158

Mellado M, Espinoza L, Madrid A, Mella J, Chávez-Weisser E, Diaz K, Cuellar M (2020). Design, synthesis, antifungal activity, and structure-activity relationship studies of chalcones and hybrid dihydrochromane-chalcones. Mol Divers 24:603-615. https://doi.org/10.1007/s11030-019-09967-y

Mirzaei H, Abastabar M, Emami S (2020). Indole-derived chalcones as anti-dermatophyte agents: In vitro evaluation and in silico study. Comput Biol Chem 84:107189. https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2019.107189

Monod M, Méhul B (2019). Recent Findings in Onychomycosis and Their Application for Appropriate Treatment. J Fungi (Basel) 5(1). https://doi.org/10.3390/jof5010020

Morão LG, Lorenzoni ASG, Chakraborty P, Ayusso GM, Cavalca LB, Santos MB, Marques BC, Dilarri G, Zamuner C, Regasini LO, Ferreira H, Scheffers DJ (2020).

Investigating the Modes of Action of the Antimicrobial Chalcones BC1 and T9A. Molecules 25(20):4596. https://doi.org/10.3390/molecules25204596

Mothana RA, Arbab AH, ElGamal AA, Parvez MK, Al-Dosari MS (2022). Isolation and Characterization of Two Chalcone Derivatives with Anti-Hepatitis B Virus Activity from the Endemic Socotraen Dracaena cinnabari (Dragon's Blood Tree). Molecules 27(3):952 https://doi.org/10.3390/molecules27030952

Nowakowska Z (2007). A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. Eur J Med Chem 42(2):125-137. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2006.09.019

Ouyang Y, Li J, Chen X, Fu X, Sun S, Wu Q (2021). Chalcone Derivatives: Role in Anticancer Therapy. Biomolecules 11(6):894. https://doi.org/10.3390/biom11060894

Rudrapal M, Khan J, Dukhyil AAB, Alarousy RMII, Attah EI, Sharma T, Khairnar SJ, Bendale AR (2021). Chalcone Scaffolds, Bioprecursors of Flavonoids: Chemistry, Bioactivities, and Pharmacokinetics. Molecules 26(23):7177 https://doi.org/10.3390/molecules26237177

Spitzer M, Robbins N, Wright GD (2017). Combinatorial strategies for combating invasive fungal infections. Virulence 8(2):169-185. https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1196300

Spivak ES, Hanson KE (2018). *Candida auris*: an Emerging Fungal Pathogen. J Clin Microbiol 56(2):e01588. https://doi.org/10.1128/JCM.01588-17

Svetaz L, Aguero MB, Alvarez S, Luna L, Feresin G, Derita M, Tapia A, Zacchino S (2007). Antifungal activity of Zuccagnia punctata Cav.: evidence for the mechanism of action. Planta Med 73(10):1074-1080. https://doi.org/10.1055/s-2007-981561

Sylla K, Tine RCK, Sow D, Lelo S, Dia M, Traoré S, Faye B, Dieng T (2019). Epidemiological and Mycological Aspects of Onychomycosis in Dakar (Senegal). J Fungi (Basel) 5(2):35. https://doi.org/10.3390/jof5020035

Thebti A, Meddeb A, Ben Salem I, Bakary C, Ayari S, Rezgui F, Essafi-Benkhadir K, Boudabous A, Ouzari H-I (2023). Antimicrobial Activities and Mode of Flavonoid Actions. Antibiotics 12(2): 225. https://doi.org/10.3390/antibiotics12020225

Valipour M (2022). Recruitment of chalcone's potential in drug discovery of anti-SARS-CoV-2 agents. Phytother Res 36(12):4477-4490. https://doi.org/10.1002/ptr.7651

Wang YH, Dong HH, Zhao F, Wang J, Yan F, Jiang YY, Jin YS (2016). The synthesis and synergistic antifungal effects of chalcones against drug resistant *Candida albicans*. Bioorg Med Chem Lett 26(13):3098-3102. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.05.013

Wangsanut T, Pongpom M (2022). The Role of the Glutathione System in Stress Adaptation, Morphogenesis and Virulence of Pathogenic Fungi. Int J Mol Sci 23(18):10645. https://doi.org/10.3390/ijms231810645

Yesudian R, Yesudian PD, Yesudian P (2021). Oral treatment of ringworm with griseofulvin. Clinical & Experimental Dermatology 46(5):993-994. https://doi.org/10.1111/ced.14415

Zhan P, Liu W (2017). The Changing Face of Dermatophytic Infections Worldwide. Mycopathologia 182:77-86. https://doi.org/10.1007/s11046-016-0082-8

Statements & Declarations

Funding: the authors declare that no funds, grants, or other support were received during the preparation of this manuscript.
Competing Interests: the authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.
Ethical approval: not applied, that no ethical approval is required.

Authors' contribution

The study conception and design were by Taiza Maschio-Lima and Margarete T. G. de Almeida. Paulo T. da Costa and Luis O. Regasini helped synthesize the compound. Taiza Maschio-Lima and Bianca G. Almeida performed the literature search and data analysis. Material preparation and data collection were performed by Taiza Maschio-Lima, Mariela D. Marques, and Thiago H. Lemes. Glaucia Rigotto Caruso and Marcia Regina von Zeska Kress carried out the toxicity test. The first draft of the manuscript was written by Taiza Maschio-Lima and João P. Z. Siqueira, and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

7 CONCLUSÕES

- Dentre os seis compostos derivados de chalconas testados no teste de triagem, o composto VS02 – 4’etil apresenta melhor atividade antifúngica, principalmente, contra os fungos dermatófitos.
- O composto VS02 – 4’etil apresenta potencial terapêutico contra os fungos dermatófitos, dados os valores de CIM menores.
- O composto VS02 – 4’etil apresenta como alvo de ação a membrana celular fúngico, demonstrando uma interação com o ergosterol.
- No ensaio de cinética de morte fica evidente que, consideradas as concentrações do composto, o comportamento fungistático variável, pode ser observado, para espécies distintas. A inibição total de *M. canis* traz uma proposta terapêutica a ser investigada com estudos clínicos futuros.
- O composto VS02 – 4’etil não apresenta toxicidade em doses igual ou menor a 250 µg/mL e, portanto, pode constituir protocolo de controle de infecções fúngicas.
- A melhor performance do composto derivado de chalcona foi observada no ensaio de *Checkerboard*, quando em combinação aos antifúngicos convencionais, demonstrou uma ação sinérgica. Esta é a atuação promissora deste composto, no auxílio e desenvolvimento de novos fármacos no tratamento das dermatomicoses, sobretudo, nas causadas pelos fungos dermatófitos.
- Investigações futuras são necessárias para elucidar propriedades farmacológicas do composto VS02–4'etil considerando a via de administração e os efeitos *in vivo* do composto.

REFERÊNCIAS

ACHTERMAN, R. R.; WHITE, T. C. Dermatophytes. **Current Biology,** v. 8, n. 13, p. R551-2, 2013.

ALLIZOND, V. et al. Advances in microbiology, infectious diseases and public health: fungal occurrence in the hair and skin of symptomatic pets in Turin, Italy. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 897, p. 55-62, 2016.

ANDRADE, J. T., et al. Design, synthesis, biological activity and structure-activity relationship studies of chalcone derivatives as potential anti-Candida agents. **Journal of Antibiotics**, v. 8, p. 702-712, 2018.

ARMON, R.; FRENKEL, M.; COHEN, D.; SEGAL, E. Dermatomycoses in the Israeli defense forces–epidemiological and clinical aspects. **Mycoses**, v. 63, p. 65–70, 2020.

ANDERSEN, P. L.; JEMEC, G. B.; SAUNTE, D. M. L. Treatment adherence and psychosocial impact of tinea capitis in families: qualitative pilot study. **Dermatology Therapy**, v. 33, n. 4, p. e13570, 2020.

APPELT, L et al. Terbinafin-resistente Dermatophytosen und Onychomykose durch *Trichophyton rubrum* [Terbinafine-resistant dermatophytoses and onychomycosis due to *Trichophyton rubrum*]. **Hautarzt**, v. 72, n. 10, p. 868-877, 2021.

ARAYA, S.; ABUYE, M.; NEGESSO, A. E. Epidemiological Characterization of Dermatomycosis in Ethiopia. **Clinical Cosmet Investigate Dermatol**, v. 14, n. 83, 2021.

AYANLOWO, O.; OLADELE, R. O. Onychomycosis: updates and management challenges. **Nigeria Journal of Postgraduate Medicine**, v. 21, p. 185-191, 2014.

BABAYANI, M., et al. Onychomycosis due to dermatophytes species in Iran: Prevalence rates, causative agents, predisposing factors and diagnosis based on microscopic morphometric findings. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 28, n. 1, p. 45-50, 2018.

BAGHI, N., et al. In vitro activity of new azoles luliconazole and lanoconazole compared with ten other antifungal drugs against clinical dermatophyte isolates. **Medical Mycology**, v. 54, p. 757-763, 2016.

BALDO, A., et al. Secreted subtilisin Sub3 from *Microsporum canis* is required for adherence to but not for invasion of the epidermis. **British Journal of Dermatology**, v. 162, p. 990–7, 2010.

BARBEDO, L. S.; SGARB, D. B. G. Candidíase. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 22, p. 22-38, 2010.

BASSETTI, M., PEGHIN, M., TIMSIT, J. F. The current treatment landscape: candidiasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, p. ii13-ii22, 2016.

BEGUM, J., et al. Recent advances in the diagnosis of dermatophytosis. **Journal of Basic Microbiology's**, v. 60, n. 4, p. 293-303, 2020.

BEUSCHER, T. L.; KELECHI, T. J. Onychomycosis Diagnosis, Treatment, and Prevention. **Journal of Wound, Ostomy, and Continence Nursing**, v. 46, n. 4, p. 333-335, 2019.

BODMAN, M. A.; KRISHNAMURTHY, K. **Onychomycosis**. [Updated 2022 May1]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.

BROWN, G. D. et al. Hidden killers: human fungal infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, p. 1-9, 2012.

CARRASCAL-CORREA, D. F.; ZULUAGA, A.; GONZALES A. Species distribution of the main etiologic agents causing skin dermatophytosis in Colombian patients: a 23-year experience at a mycological reference center. **Mycoses**, v. 63, p. 494–499, 2020.

CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, v. 1, n. 133, p. 86-96, 2017.

CAUCHIE, M; DESMET, S; LAGROU, K. *Candida* and its dual lifestyle as a commensal and a pathogen. **Research in Microbiology**, v. 168, n. 9-10, p. 802-810, 2017.

CLSI. **M38- 3rd. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi**; Approved Standard — Third Edition. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2017a.

CLSI. **M27 – ed4. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Standard** — 4th Edition. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2017b.

CHAMORRO, M. J.; HOUSE, S. A. *Tinea Manuum*. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.

COLOSI, I. A., et al. Dermatophytes and dermatophytosis in Cluj-Napoca, Romania-A 4-year cross-sectional study. **Journal Fungi**, v. 6, p.154, 2020.

CORRALO, D. S.; HERAS-ALONSO, M. E.; ACEBES, L. O. Infecciones cutáneas. **Medicine**, v. 11, p. 2755-2763, 2014.

COULIBALY O., L'OLLIVIER C., PIARROUX R., RANQUE S. Epidemiology of human dermatophytoses in Africa. **Medical Mycology**, v. 56, p. 145–161, 2018.

DATTA, P., et al. Epidemiology and Antifungal Susceptibility of *Candida* Species Isolated from Urinary Tract Infections: A Study from an Intensive Care Unit of a Tertiary Care Hospital. **Indian Journal of Critical Care Medicine**, v. 22, p. 56-58, 2018.

DAY, A M., et al. Hog1 Regulates Stress Tolerance and Virulence in the Emerging Fungal Pathogen *Candida auris*. **mSphere**, v. 3, p. 5, 2018.

DE HOOG, G. S. et al. Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 182, p. 5–31, 2017.

DE MELLO, M. V. P., et al. Comprehensive review of chalcone derivatives as antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 150, p. 920–929, 2018.

DI CHIACCHIO, N., et al. Superficial mycoses at the Hospital do Servidor Público Municipal de São Paulo between 2005 and 2011. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 1, p. 67, 2014.

DOAN, T. N.; TRAN, D. T. Synthesis, antioxidant and antimicrobial activities of a novel series of chalcones, pyrazolic chalcones, and allylic chalcones. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 2, n. 04, p. 282, 2011.

DO, N. A.; NGUYEN, T. D.; NGUYEN, K. L.; LE, T. A. Distribution of species of dermatophytes among patients at a dermatology centre of Nghean Province, Vietnam, 2015-2016. **Mycopathologia**, v. 182, p. 1061–1067, 2017.

DOĞAN, I., et al. New azole derivatives showing antimicrobial effects and their mechanism of antifungal activity by molecular modeling studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 130, p. 124-138, 2017.

DUEK, L., KAUFMAN, G., ULMAN, Y., BERDICEVSKY, I. The pathogenesis of dermatophyte infections in human skin sections. **Journal of Infection**, v. 48, p. 175–80, 2004.

DURAN, N., et al. New chalcone derivatives as effective against SARS-CoV-2 agent. **International Journal of Clinical Practice**, v. 75, n. 12, p. e14846, 2021.

ESCALANTE, A., GATTUSO, M., PÉREZ, P., ZACCHINO, S. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from Phytolacca tetramera Hauman. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 10, p. 1720–1725, 2008.

EL-GOHARY, M. et al. Topical antifungal treatments for *Tinea cruris* and *Tinea corporis*. **The Cochrane Database Systematic Reviews**, n. 8, 2014.

ELY, J.W.; ROSENFELD, S.; SEABURY, S. M. Diagnosis and management of tinea infections. **American Family Physician**, v. 90, n. 10, p. 702-710, 2014.

FERREIRA, T. S., et al. Phytotherapy: an introduction to its history, use and application. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 2, p. 290-298, 2015.

FEUILHADE, C. M. Traitement des onychomycoses [Treatment of onychomycosis]. **Journal of Medical Mycology**, v. 24, n. 4, p. 296-302, 2014.

FICH, F., et al. *Candida parapsilosis* and *Candida guillermondii*: emerging pathogens in nail candidiasis. **Indian Journal of Dermatology**, v. 59, n. 1, p. 24-29, 2019.

FORSBERG, K, et al. *Candida auris*: The recent emergence of a multidrug-resistant fungal pathogen. **Medical Mycology**, v. 57, n. 1, p.1-12, 2019.

GE, G., et al. Onychomycosis with greenish-black discolorations and recurrent onycholysis caused by *Candida parapsilosis*. **Medical Mycology Case Reports**, v. 24, p. 48-50, 2019.

GINTER-HANSELMAYER, G. Update on clinics, diagnosis and treatment of dermatophytosis. **Mycoses**, v. 55, p. 4, 2012.

GŁADKOWSKI, W., et al. Chalcone-Derived Lactones: Synthesis, Whole-Cell Biotransformation, and Evaluation of Their Antibacterial and Antifungal Activity. **Molecules**, v. 28, p. 3800, 2023.

GODOY-MARTINEZ, P., et al. Onychomycosis in São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, v. 168, n. 3, p. 111–116, 2009.

GORDON, A. K., et al. Clinical application of a molecular assay for the detection of dermatophytosis and a new non-invasive sampling technique. **Patologia**, v. 48, p. 720-726, 2016.

GRUMBT, M., et al. Keratin degradation by dermatophytes depends on cysteine dioxygenase and a sulphite efflux pump. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, p. 1, 2013.

GUPTA, A.K.; CHOW, M.; DANIEL, C.R; ALY, R. Treatments of *Tinea pedis*. **Dermatology Clinical**, v. 21, n. 3, p. 431-62, 2003.

GUPTA, A. K.; PAQUET, M.; SIMPSON, F. C. Therapies for the treatment of onychomycosis. **Clinics in Dermatology**, v. 31, p. 544–554, 2013.

GUPTA, D., JAIN, D. K. Chalcone derivatives as potential antifungal agents: Synthesis, and antifungal activity. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research,** v. 6, n. 3; p. 114-7, 2015.

GUPTA, A. K., et al. Onychomycosis in the 21st Century: An Update on Diagnosis, Epidemiology, and Treatment. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 21, n. 6, p. 525-539, 2017.

GUPTA, A. K.; STEC, N. Recent advances in therapies for onychomycosis and its management. **F1000Research**, v. 25, n. 8, F1000 Faculty Rev-968, 2019.

GUPTA, A. K., et al. High prevalence of mixed infections in global onychomycosis. **PLoS ONE**, v. 15, n. 9, p. 1–8, 2020a.

GUPTA, A. K., et al. Onychomycosis: A review. **European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 34, p. 1972–1990, 2020b.

GUPTA, A. K., et al. The growing problem of antifungal resistance in onychomycosis and other superficial mycoses. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 22, n. 2, p. 149-157, 2021.

GUPTA, A.K.; FRIEDLANDER, S.F.; SIMKOVICH, A.J. *Tinea capitis*: An update. **Pediatric Dermatology**, v. 39, n. 2, p. 167-172, 2022.

GUPTA, A. K., et al. Diagnosing Onychomycosis: What's New? Journal of Fungi (Basel), v. 29, n.8, p. 464, 2022.

GUPTA, A. K.; VENKATARAMAN, M. Antifungal resistance in superficial mycoses. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 33, n. 4, p. 1888-1895, 2022.

HAVLICKOVA, B., CZAIKA, V. A., FRIEDRICH, M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. **Mycoses** v. 51, n. Suppl. 4, p. 2–15, 2008.

HAY, R. J., et al. The global burden of skin disease in 2010: an analysis of the prevalence and impact of skin conditions. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, p. 1527–1534, 2014.

HAY, R. J. *Tinea Capitis*: Current Status. **Mycopathologia**, v. 182, n. 1-2, p. 87-93, 2017.

HERNÁNDEZ, T. et al. Tinhas do couro cabeludo em idade pediátrica. **Revista do hospital de crianças Maria Pia**, v. 13, n.1, 2004.

HOFBAUER, G. F.; SECKIN, D.; GJERSVIK, P.; BOUWES, B. J. N. Skin Care in Organ Transplant Patients Europe Meeting Report from Annual Meeting, Leiden, The Netherlands. **Journal of Investment Dermatology**, v. 134, p. 2861-2863, 2014.

HOSPENTHAL, D. R.; RINALDI, M. G. **Diagnosis and Treatment of Fungal Infections**. 2 ed., Springer International Publishing, ISBN 978-3-319-13090-3, 2015.

IGNASIAK, K; MAXWELL, A. *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. **BMC Research Notes**, v. 29, n. 10(1), p. 428, 2017.

ILKIT, M.; DURDU, M. *Tinea pedis*: The etiology and global epidemiology of a common fungal infection. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 374–388, 2014.

ILYAS, M.; SHARMA, A. Cutaneous fungal infections in solid organ transplant recipientes. **Transplantation Reviews**, v. 31, n. 3, p. 158-165, 2017.

KAUL, S.; YADAV, S.; DOGRA, S. Treatment of dermatophytosis in elderly, children, and pregnant women (Review Article). **Indian Dermatology Online Journal**, v. 8, p. 310, 2017.

KELLY, B.P. Superficial fungal infections. **Journal of Pediatrics Review**, v. 33, n. 4, p.e22-e37, 2012.

KHODADADI, H. et al. Prevalence of superficial-cutaneous fungal infections in Shiraz, Iran: A five-year retrospective study (2015–2019). **Journal of Clinical Laboratorial Anal**, v. 35, p. 1-6, 2021.

KHURANA, A. et al. Reinterpreting minimum inhibitory concentration (MIC) data of itraconazole versus terbinafine for dermatophytosis - time to look beyond the MIC data? **Indian Journal of Dermatology, Venereology & Leprology**, v. 84, p. 61-63, 2018.

KHURANA, A.; SARDANA, K.; CHOWDHARY, A. Antifungal resistance in dermatophytes: Recent trends and therapeutic implications. **Fungal Genetics and Biology**, v. 132, 103255, 2019.

KSIEZOPOLSKA, E.; GABALDON, T. Evolutionary emergence of drug resistance in *Candida* opportunistic pathogens. **Genes (Basel)**, v. 9, n. 9, p. 461, 2018.

KETABFOROOSH, H., et al. Synthesis and anti-cancer activity evaluation of new dimethoxylated chalcone and flavanone analogs. **Archives of Pharmacal Research**, v. 347, p. 853-860, 2014.

KLEPSER, M et al. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. **Antimicrobials Agents and Chemotherapy,** v. 42, n., p. 1207 - 1212, 1998.

KUMAR, S N et al. Activity and synergistic interactions of stilbenes and antibiotic combinations against bacteria in vitro. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 11, p. 3143–3150, 2012.

KURUVELLA, T.; PANDEY, S. **Tinea barbae**. In: StatPearls.Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.

LACAZ, C.S., et al. **Tratado de Micologia médica**. Prefácio: Bertrand Dupont. 9. ed. São Paulo, Sarvier, 1104p, 2002.

LAKSHMIPATHY, D. T.; KANNABIRAN, K. Review on dermatomycosis: pathogenesis and treatment. **Natural Science**, v. 2, p. 726-731, 2010.

LEMES, T.H., et al. Combinatorial effect of fluconazole, itraconazole, and terbinafine with different culture extracts of *Candida parapsilosis* and *Trichophyton* spp. against *Trichophyton rubrum*. **Internacional Microbiology**, 2023.

LEON-GONZALEZ, A., et al. Chalcones as promising lead compounds on cancer therapy. **Current medicinal chemistry**, v. 22, n. 30, p. 3407-3425, 2015.

LETAFAT, B., et al. Synthesis and in vitro cytotoxic activity of novel chalcone-like agentes Iran. **Journal of Basic Medical Sciences**, v. 16, p. 1155-1162, 2013.

LEUNG, A. K. C., et al. Onychomycosis: An Updated Review. **Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery**, v. 14, n. 1, p. 32–45, 2019.

LIM, S. Diagnosis of Onychomycosis: From Conventional Techniques and Dermoscopy to Artificial Intelligence. **Frontiers in Medicine**, v. 8, 2021.

LIPNER, S. R.; SCHER, R. K. Onychomycosis: clinical overview and diagnosis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 80, p. 835–851, 2019.

LIPNER, S. R., et al. Therapeutic Recommendations for the Treatment of Toenail Onychomycosis in the US. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 20, n. 10, p. 1076–1084, 2021.

LÓPEZ, S. N., et al. In vitro antifungal evaluation and structure-activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 8, p. 1999-2013, 2001.

MAHAPATRA, D.K.; BHARTI, S.K; ASATI, V. Chalcone scaffolds as anti-infective agents: structural and molecular target perspectives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, p. 496-524, 2015.

MARQUES, B. C., et al. Methoxychalcones: effect of methoxyl group on the antifungal, antibacterial and antiproliferative activities. **Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 7, p. 881-891, 2020.

MARTINEZ-ROSSI, N. M. State-of-the-Art Dermatophyte Infections: Epidemiology Aspects, Pathophysiology, and Resistance Mechanisms. **Journal of Fungi (Basel)**, v. 3, n. 7, p. 629, 2021.

MAXFIELD, L., et al. **Terbinafine**. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL):StatPearls Publishing, 2022.

MCCARTY, T. P.; WHITE, C. M.; PAPPAS, P. G. Candidemia and Invasive Candidiasis. **Infectious Diseases Clinics of North America**, v. 35, n. 2, p. 389-413, 2021.

MICHALKOVA, R, et al. Molecular Mechanisms of Antiproliferative Effects of Natural Chalcones. **Cancers (Basel)**, v. 13, n. 11, p. 2730, 2021.

MIRZAEI, H.; KEIGHOBADI, M; EMAMI, S. An overview of anticancer chalcones with apoptosis inducing activity. **Journal of Mazandaran University of Medical Sciences**, v. 26, p. 254-268, 2017.

MIRZAEI, H.; ABASTABAR, M.; EMAMI, S. Indole-derived chalcones as anti-dermatophyte agents: In vitro evaluation and in silico study. **Computational Biology and Chemistry**, 2020.

MOBIN, M., et al. Antifungal Susceptibility of *Candida* Species Isolated from Horticulturists with Onychomycosis in Piauí, Brazil. **Iran Journal Public Health**, v. 47, n. 12, p. 1816-1821, 2018.

MONOD, M., et al. Aminopeptidases and dipeptidyl-peptidases secreted by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Microbiology**, v. 15, p. 145–55, 2005.

MONOD, M.; MÉHUL, B. Recent Findings in Onychomycosis and Their Application for Appropriate Treatment. **Journal of Fungi (Basel)**, v. 22, n.1, p. 2, 2019.

MORGADO, L. F., et al. Photodynamic Therapy treatment of onychomycosis with Aluminium-Phthalocyanine Chloride nanoemulsions: A proof of concept clinical trial. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 173, p. 266-270, 2017.

MOTHANA, R. A., et al. Isolation and Characterization of Two Chalcone Derivatives with Anti-Hepatitis B Virus Activity from the Endemic Socotraen Dracaena cinnabari (Dragon's Blood Tree). **Molecules**, v. 27, n. 3, p. 952, 2022.

MOSKALUK, A. E.; VANDEWOUDE, S. Current Topics in Dermatophyte Classification and Clinical Diagnosis. **Pathogens**, v. 11, n. 9, p. 957, 2022.

MURMU, S. et al. Detection and characterization of zoonotic dermatophytes from dogs and cats in and around Kolkata. **Veterinary World**, v. 8, p. 1078-1082, 2015.

NASCENTES, J. A. S., et al. Síntese e Avaliação de Análogos da 2',4'-Dimetoxichalcona Contra Fungos Dermatófitos. In.: **V Simpósio de Biociências e Microbiologia**, 2020.

NENOFF, P.; KRÜGER, C.; GINTER-HANSELMAYER, G.; TIETZ, H. J. Mycology - an update. Part 1: Dermatomycoses: causative agents, epidemiology and pathogenesis. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 12, n. 3, p. 188-209, 2014.

NOWAKOWSKA, Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 125-137, 2007.

OREN, I., PAUL, M. Up to date epidemiology, diagnosis and management of invasive fungal infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, p. 1-4, 2014.

OUYANG, Y., et al. Chalcone Derivatives: Role in Anticancer Therapy. **Biomolecules**, v. 1, p. 894, 2021.

PAŠKEVIČIUS, A., et al. *Candida* distribution in onychomycosis and *in vitro* susceptibility to antifungal agents. **Acta Dermatovenerol Croatica**, v. 28, n. 7, p. 204-209, 2020.

PEREIRA, F. L. Estado atual das micoses cutâneas no Brasil - uma revisão narrativa. **Monografia (Medicina) Centro Universitário de Brasília – UNICEUB**, p. 18, 2022.

PETRUCELLI, M. F., et al. Diagnostic Perspectives of Dermatophytoses. **Journal of Fungi (Basel)**, v. 23, n. 4, p. 310, 2020.

PIPPIN, M. M.; MADDEN, M. L.; DAS, M. ***Tinea Cruris***. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls, 2022.

PIRACCINI, B; ALESSANDRINI, A. Onychomycosis: A Review. **Journal of Fungi**, v. 1, n. 1, p. 30–43, 2015.

PIRES, C. A. A., et al. Clinical, epidemiological, and therapeutic profile of dermatophytosis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, p. 259-264, 2014.

QUINDÓS, G. et al. Enfermedad fúngica invasora: Diagnóstico micológico convencional molecular. **Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica**, v. 30, p. 560-571, 2012.

RAMOS, M. A. S., et al. Syngonanthus nitens Bong.(Rhul.)-loaded nanostructured system for vulvovaginal candidiasis treatment. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 8, p. 1368, 2016.

RATHER, S et al. Candidal onychomycosis: Clinicoepidemiological profile, prevailing strains, and antifungal susceptibility pattern-a study from a tertiary care hospital. **Indian Journal of Dermatology**, v. 66, n. 2, p. 132–137, 2021.

RIVAS, L.; MÜHLHAUSER, M. Complejo *Trichophyton mentagrophytes [Trichophyton mentagrophytes* complex]. **Revista Chilena Infectología**, v. 32, n. 3, p. 319-20, 2015.

ROTTA, I., et al. Efficacy of Topical Antifungals in the Treatment of Dermatophytosis: A Mixed-Treatment Comparison Metaanalysis Involving 14 Treatments. **JAMA Dermatology**, v. 149, p. 341-349, 2013.

RUDRAPAL, M., et al. Chalcone Scaffolds, Bioprecursors of Flavonoids: Chemistry, Bioactivities, and Pharmacokinetics. **Molecules**, v. 26, n. 23, p. 7177, 2021.

SACHELI, R., et al. Epidemiology of Dermatophytes in Belgium: A 5 Years' Survey. **Mycopathologia**, v. 186, n. 3, p. 399-409, 2021.

SAKKAS, H., et al. Onychomycosis in Northwestern Greece over a 7-year period. **Pathogens**, v. 9, n. 851, 2020.

SAMANTA, I. Cutaneous, Subcutaneous and Systemic Mycology. **Veterinary Mycology**, v. 31, p. 11–153, 2015.

SANTOS, M. B., et al. Antiproliferative activity and p53 upregulation effects of chalcones on human breast cancer cells. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 34, n. 1, p. 1093-1099, 2019.

SANTOS, M. B., et al. Antiproliferative and pro-apoptotic activities of 2′-and 4′-aminochalcones against tumor canine cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 138, p. 884-889, 2017.

SARDANA, K.; GUPTA, A.; MATHACHAN, S. R. Immunopathogenesis of Dermatophytoses and Factors Leading to Recalcitrant Infections. **Indian Dermatology Online Journal**, v. 12, n. 3, p. 389-399, 2021.

SARDI, J. C., et al. Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 10-24, 2013.

SEGAL, R., et al. Onychomycosis in Israel: epidemiological aspects. **Mycoses**, v. 58, p. 133–139, 2015.

SEGAL, E.; ELAD, D. Human and Zoonotic Dermatophytoses: Epidemiological Aspects. **Front Microbiology**, v. 12, p. 713532, 2021.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1 ed, 2010.

SIKORA. A., HASHMI, M. F., ZAHRA, F. ***Candida Auris***. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.

SIVAKUMAR, P.M.; KUMAR, T. M.; DOBLE, M. Antifungal activity, mechanism and QSAR studies on chalcones. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 74, p. 68-79, 2009.

SHAFIEI, M., et al. History of the development of antifungal azoles: a review on structures, sar, and mechanism of action. **Bioorganic Chemistry**, v. 104, 104240, 2020.

SHEMER, A. et al. Clinical significance of *Candida* isolation from dystrophic fingernails. **Mycoses**, n. 63, p. 964– 969, 2020.

SHY, R. *Tinea Corporis* and *Tinea Capitis*. **Pediatrics in Review**, v. 28, n. 5, p. 164–174, 2007.

SILVA, S., et al. *Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, p. 288-305, 2012.

SILVA-ROCHA, W. P.; DE AZEVEDO, M. F.; CHAVES, G. M. Epidemiology and fungal species distribution of superficial mycoses in Northeast Brazil. **Journal of Medical Mycology**, v. 27, p. 57–64, 2017.

SIGURGEIRSSON, B.; BARAN, R. The prevalence of onychomycosis in the global population? A literature study. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 28, n. 11, 2014.

SINGH, A., et al. High terbinafine resistance in Trichophyton interdigitale isolates in Delhi, India harbouring mutations in the Squalene epoxidase (SQLE) gene. **Mycoses**, v. 61, p. 477–484, 2018.

SOUZA, E. A. F., et al. Freqüência de onicomicoses por leveduras em Maringá, Paraná, Brasil. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 82, p. 151-156, 2007.

SOUZA, L. K. H., et al. Epidemiological and mycological data of onychomycosis in Goiania, Brazil: Onychomycosis in Goiania, Brazil. **Mycoses**, v. 53, n. 1, p. 68–71, 2010.

STÄNDER, H.; STÄNDER, M.; NOLTING S. Häufigkeit des Pilzbefalles bei Nagelpsoriasis [Incidence of fungal involvement in nail psoriasis]. **Hautarzt**, v. 52, n. 5, p. 418-22, 2001.

SUDBERY, P. E. Growth of *Candida albicans* hyphae. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 737–748, 2011.

SVETAZ, L., et al. Antifungal activity of Zuccagnia punctata Cav.: evidence for the mechanism of action. **Planta Medica**, v. 73, n. 10, p. 1074-1080, 2007.

SYLLA, K., et al. Epidemiological and Mycological Aspects of Onychomycosis in Dakar (Senegal). **Journal of Fungi** (Basel), v. 5, n. 2, p. 35, 2019.

TAKAC, P., et al. Antiproliferative Effect of Acridine Chalcone Is Mediated by Induction of Oxidative Stress. **Biomolecules**, v. 10, p. 345, 2020.

TCHERNEV, G., et al. Onychomycosis: modern diagnostic and treatment approaches. Wien Med Wochenschr. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 20, n. 10, p.1076-1084, 2012.

VALIPOUR, M. Recruitment of chalcone's potential in drug discovery of anti-SARS-CoV-2 agents. **Phytotherapy Research**, v. 36, n. 12, p. 4477-4490, 2022.

VELASQUEZ-AGUDELO, V., CARDONA-ARIAS, J. A. Meta-analysis of the utility of culture, biopsy, and direct KOH examination for the diagnosis of onychomycosis. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 166, 2017.

VENTURA, T. L. B., et al. Antimycobacterial and anti-inflammatory activities of substituted chalcones focusing on an anti-tuberculosis dual treatment approach. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 8072-8093, 2015.

XIAO S., et al. Design, synthesis, and structure-activity relationships of 2-benzylidene-1-indanone derivatives as anti-inflammatory agents for treatment of acute lung injury. **Drug Design, Development and Therapy,** v. 12, p. 887–899, 2018.

WANG, Y. H., et al. The synthesis and synergistic antifungal effects of chalcones against drug resistant *Candida albicans*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, p. 3098–3102, 2016.

WATANABE, S, ISHIDA, K. Molecular Diagnostic Techniques for Onychomycosis: Validity and Potential Application. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 18, n. 2, p. 281-286, 2017.

WIDDERS, G.; SAGEBIEL, D. *Tinea corporis* [*Tinea corporis*]. **Gesundheitswesen**, v. 75, 2013.

YADAV, N. et al. Antimalarial activity of newly synthesized chalcone derivatives in vitro. **Chemical biology & drug design**, v. 80, n. 2, p. 340-347, 2012.

YESUDIAN R, YESUDIAN P. D., YESUDIAN P. Oral treatment of ringworm with griseofulvin. **Clinical & Experimental Dermatology,** v. 46, n. 5, p. 993-994, 2021.

ZISOVA, L., et al. Onychomycosis in patients with psoriasis – a multicentre study. **Mycoses**, p. 190-193, 2013.

ZHAN, P.; LIU, W. The changing face of dermatophytic infections worldwide. **Mycopathologia**, v. 182, p. 77-86, 2017.

ZHANG, J., et al. Efficacy of laser therapy combined with topical antifungal agentsfor onychomycosis: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. **Lasers in Medical Science**, v. 37, n. 6, p. 2557-2569, 2022.

ZHUANG, C., et al. Chalcone: A privileged structure in medicinal chemistry. **Chemical Reviews**, v. 117, p. 7762–7810, 2017.