UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADA A FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS

KAILA PETRONILA MEDINA ALARCÓN

"AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *in vitro* DE CHALCONAS E PROTOCATECUATOS INCORPORADOS NO SISTEMA NANOESTRUTURADO LIPÍDICO CONTRA O COMPLEXO *Paracoccidioides*"

ORIENTADORA: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida

COORIENTADORA: Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini

Araraquara

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADA A FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS

"AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *in vitro* DE CHALCONAS E PROTOCATECUATOS INCORPORADOS NO SISTEMA NANOESTRUTURADO LIPÍDICO CONTRA O COMPLEXO *Paracoccidioides*"

KAILA PETRONILA MEDINA ALARCÓN

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP como pré-requisito para obtenção do título de Mestre.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida

COORIENTADORA: Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini

Araraquara

2014

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a vocês que me fizeram querer ser melhor a cada dia, que acreditaram na realização dos meus sonhos e que apoiaram incondicionalmente para que eu pudesse concretizá-los, a meus pais, Claudia e Modesto e aos meus irmaos.

A você Ewerthon, meu companheiro no amor, na vida e nos sonhos, que caminha sempre ao meu lado nas dificuldades e nas alegrias

A Katy minha pequena filha, que não esta mais conosco, que me deu seu amor e cuidou de mim a sua vida toda, um anjo que ainda cuida de mim, amo todos vocês.

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a Deus por todo o amor que me tem, por me abençoar sempre em todo momento e mesmo que muitas vezes eu não entenda todas as dificuldades que possa ter passado sei que é para me aperfeiçoar e agradeço por elas, pelas conquistas, mas em especial agradeço ter me abençoado com uma família maravilhosa que me ensina sempre a querer ser melhor e minhas conquistas são as deles também, por isso agradeço à minha família: à minha mãe Cláudia, ao meu pai Modesto, que me ensinaram que tudo na vida se conquista com muito trabalho e honestamente, aos meus irmãos Rocio, Abner, Ethel, Enech e em especial para David, o mais novo deles, meu pequeno irmão que cuidei com muito amor e hoje está se tornando um grande homem que ama e valoriza a sua família estou muito orgulhosa de você ao meu querido esposo Ewerthon Silva, meu companheiro de todas às horas e a minha pequena filha Katy, que mesmo que não está conosco sempre será meu anjo da guarda, ao pequeno Thomas que é alegria da casa a vocês que sempre me apoiaram e fortaleceram incondicionalmente em todos os momentos. Agradeço ainda a todos os meus familiares que sempre demonstraram um carinho enorme em todo momento e me apoiaram nas minhas decisões.

Agradeço à minha orientadora Professora Doutora Ana Marisa Fusco Almeida, à Professora Doutora Maria José Soares Mendes Giannini, as quais me proporcionaram a oportunidade do meu desenvolvimento profissional no meu mestrado e ao Professor Doutor Marlus Chorilli que me brindou a oportunidade de conhecer e trabalhar com nanotecnologia, o que me está permitindo meu crescimento profissional também nesta área. Agradeço a orientação, a dedicação e a confiança que depositaram em mim, as quais me permitiram evoluir profissionalmente. Obrigada pela oportunidade.

Agradeço às Professoras Dras. Vanderlan da Silva Bolzani e Dulce Helena Siqueira Silva, ao Professor Dr. Luis Octávio Regasini, e aos alunos Luiz Dutra e Maicon Segalla Petrônio que por meio dos projetos Biota-FAPESP, Bioprospecta-FAPESP, e SisBiota do Instituto de Química da UNESP–Araraquara, me brindaram a oportunidade de trabalhar com as substancias que deram origem ao desenvolvimento da minha dissertação de mestrado.

Ao Professor Doutor Luis Octávio Regasini que sempre nos ajuda com inúmeras questões e pedidos.

Agradeço ao Pessoal do laboratório do Núcleo de Proteomica supervisionado pela Profas. Dras. Maria José Soares Mendes Giannini e Ana Marisa Fusco Almeida, onde desenvolvi toda a parte biológica da minha pesquisa, à Técnica Claudia Tavares pela ajuda que sempre nos dá e pelas muitas vezes que brindou sua ajuda nas minhas analises, as Pós-doutorandas Janaina Sardi e Aline Voltan pela amizade, pela ajuda cientifica brindada e conversas do mesmo, à mestranda Patricia Akemi pela orientação e ajuda na fase inicial da Proteomica, à Pós-doutoranda Regina Pires e a Doutoranda Fernanda Sangali pelo apoio na fase final do analises da proteomica, a Dona conceição, Rosemira e Rosangela que sempre nos apoiam e pela amizade, pelas energias positivas de Junya, Giovana, as Carolines, a Suelen pelas boas conversas e conselhos, Haroldo, Jaqueline, Julhiany, a Panta, as Fernandas a Nayla a todos.

Agradeço ao pessoal do laboratório da Farmacotécnica supervisionado pelo Professor Dr. Marlus Chorilli onde desenvolvi o nanoestruturado e realizei a parte inicial da caracterização físico-química à Professora Dra. Maria Palmira Daflon Gremião pelas sugestões brindadas, a Técnica Natalia pela ajuda brindada em todo momento e pelos conselhos científicos, a Pós-doutoranda Patricia Bento por me ensinar a preparar o nanoestruturado, pelo apoio, a todos.

Aos Professores da Toxicologia que me permitiram fazer uso do sonicador, quando ficou em falta no laboratório da Farmacotecnia,

Ao Professor Dr. Marcelo Orgahi Orlandi do Laboratório de Microscopia de varredura de alta resolução do Instituto de Química da UNESP pela utilização do microscópio eletrônico de varredura em especial a técnica Sonia pela gentil ajuda durante toda analise,

Ao Prof. Dr. Mario Sérgio Palma que supervisiona o Laboratório Estrutural de Biologia e Zooquímica, do Departamento de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" UNESP- Rio Claro e a seu grupo de pesquisa que me receberam muito gentilmente e apoio durante minha permanência para culminar o sequenciamento das proteínas do meu projeto, em especial à Doutoranda Anally Menegasso, ao aluno de iniciação cientifica Marcell que me ajudaram durante toda a analise, e me deram tudo suporte durante minha estadia na UNESP-Rio Claro, Doutorando Jose Roberto pela ajuda técnica.

A todos os integrantes dos laboratórios mencionados, entre eles estudantes de iniciação científica, mestrandos, técnicos, doutorandos e pós-doutorandos. que me apoiaram durante meu trabalho.

Nestes dois anos de mestrado, foram inúmeras as pessoas que conheci, trabalhei e pude compartilhar experiências, que só a vida nos dá. Mas, dessas pessoas algumas são mais especiais, Aline obrigada pela ajuda, sua amizade e pelas boas conversas, Fernanda Kolenkay mesmo conhecendo-a a pouco tempo a considero uma amiga para todas as horas, com sotaque Mexicano “dale muchacha!”, a Jessica Bernegosi amiga que me apresentou ao grupo da Farmacotecnia amiga de boas conversas e todas as horas a Vanessa a Japinha mais simpática que conheço que me ajudou com minhas analises no Zetasizer, Camila obrigada pela ajuda no momento de aperto, Anally e Marcel pela amizade o acolhimento obrigada a todos.

A todos os que passaram nestes dois anos tantas pessoas diferentes, mas que cada uma me completa de uma maneira diferente, fazendo parte da minha história.

SUMÁRIO.

LISTA DE UNIDADES E ABREVIATURAS I
LISTA DE TABELAS II
LISTA DE FIGURAS II
RESUMO IV
ABSTRACT V

Capitulo 1
1. INTRODUÇÃO
1.1 Epidemiologia e Taxonomia 1
1.2 Patogênese 3
1.2.1.Moléculas de Adesinas de *Paracoccidiodes sp.* 4
1.3 Tratamento 7
1.4. Antifúngico de Origem Natural 9
1.5 chalconas 11
1.6 Protecatecautos 13
1.7 Nanotecnologia e Sistemas de Liberação 15
1.7.1. Nanoemulsões 16
1.7.2. Microemulsões 17
1.7.3. Lipossomas 18
1.7.4. Principais componentes utilizados no preparo do sistema nsnoestruturado lipídico 19
1.8 Teste de Sensibilidade 21
1.9 Análise Proteômica 23
2. OBJETIVOS 26
2.1.Objetivos Gerais 26
2.2. Objetivos Específicos 26
3.METODOLOGIA 27
3.1. Preparo das substâncias 27
3.2. Microrganismos e condições de cultivo 27
3.3. Preparação do Inóculo 27
3.4. Teste de Sensibilidade 28
3.5. Avaliação da atividade antifúngica 28
3.6. Análise da inibição do crescimento do fungo (InCell Analyzer 2000) 29
3.7. Cultura de células 30
3.8. Avaliação da citotoxicidade 30
3.9. Preparação do sistema nanoestruturado 31
3.10. Caracterização físico química 31
3.10.1. Determinação do diâmetro e do índice de polidispersão 31
3.10.2. Caracterização do potencial zeta das nanopartículas 32
3.10.3. Determinação da morfologia do Sistema Nanoestruturado Lipídico 32
3.11. Adesão de *P. brasiliensis* (Pb18) às matrizes extracelulares artificiais 32
3.12. Ensaio de inibição da adesão de *P. brasiliensis* às matrizes extracelulares artificiais 33
3.13. Análise do perfil proteômico 33
3.13.1 Cultivo e tratamento do microrganismo 33
3.13.2 . Extração total de proteínas 34
3.13.3Determinação da concentração de proteínas totais: Método Bradford 34

3.13.4 Análise do perfil protéico por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 35
3.13.5 Precipitação da amostra 35
3.13.6. Reidratação da fita 36
3.13.7. Focalização Isoelétrica (IEF) – 1ª Dimensão 36
3.13.8. Equilíbrio das fitas 36
3.13.9.Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódi (SDS-PAGE) 37
3.13.10. Espectrometria de massas por MALDI TOF/TOF 37
3.13.11. Preparo dos *spots* 38
3.13.12. Digestão tríptica 38
3.13.13. Eluição dos peptídeos 38
3.13.14. Dessalinização das amostras 39
3.13.15. Aplicação das amostras na placa de MALDI TOF TOF 39
4. RESULTADOS
4.1. Determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) dos antifúngicos comerciais 40
4.2. Triagens de substâncias vegetais 41
4.2.1. Determinação da CIM das Chalconas 41
4.2.2. Determinação da CIM dos protocatecuatos 43
4.2.3 Ensaio de citotoxicidade da anfotericina B e itraconazol 45
4.2.4. Ensaio de citotoxicidade das chalconas 46
4.2.5. Ensaio de citotoxicidade dos protocatecuatos 48
4.3. Caracterização físico química do Sistema Nanoestruturado lipídico 51
4.3.1. Caracterização do diâmetro e do índice de polidispersão das nanoparticulas 51
4.3.2. Determinação do potencial zeta das nanopartículas 55
4.3.3. Determinação da morfologia do Sistema Nanoestruturado Lipídico 56
4.4. Determinação da CIM das chalconas e protocatecuatos incorporadas no sistema Nanoestruturado 60
4.5. Análise confirmatoria do teste de sensibilidade para Pb18 62
4.6. Teste de citoxicidade das chalconas e protocatecuatos incorporadas no sistema nanoestruturado lipídico**.** 66
4.7. Ensaios para Verificação da Adesão 68
4.8. Ensaios para Verificação da Inibição da Adesão 70
4.9. Determinação das proteínas totais 73
4.9.1Análises proteica por eletroforese bidimensional (2D PAGE) 73
4.9.2. Análise da espectrometria de massas Sequenciamento MALDI TOF TOF 77
5. DISCUSSÃO 98
6. CONCLUSÃO 116
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 117
Capitulo 2 138
2.1 Artigos 139

LISTA DE UNIDADES E ABREVIATURAS

µg: microgramas

µM: micromolar

nm: nanômetros

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

pI: ponto isoelétrico

2D: bidimensional

SDS-PAGE: gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

CIM: concentração inibitória mínima

RPMI-1640: *Roswell Park Memorial Institute* medium

PCM: paracoccidioidomicose

PBS: tampão fosfato, pH 7,2

HIV/Aids: Human Immunodeficiency Virus / Síndrome da imunodeficiência adquirida

MEC: matriz extracelular

KDa: kilodaltons

gp: glicoproteína

ITC: itraconazol

AMB: anfotericina B

CLSI: *Clinical Laboratory Standard Institute*

NCCLS: *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

MABA: *Microplate Alamar Blue Assay*

MTT: brometo de (3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

SRB: Sulforodamida B

IC_{50}: concentração capaz de inibir 50 %

IS: índice de seletividade

ATCC: *American Type Culture Collection*

BHI: *Brain and Heart Infusion*

rpm: rotações por minuto

SNL: Sistema nanoestruturado

SNL+2-chalc : 2-chalcona incorporado no sistema Nanoestruturado

SNL+dodecila: dodecila incorporado no sistema Nanoestruturado

SNL+ 2’-chalc: 2’-chalcona incorporado no sistema Nanoestruturado

SNL+ decila: decila incorporado no sistema Nanoestruturado

SNL+ anfo: anfotericina B incorporado no sistema Nanoestruturado

MEC: Matrize extracelular

UFC/mL: Unidade formadora de colônia por mililitros

DTT: Ditiotreitol

PDI: Indice de Polidispersão

PZ: Potencial Zeta

MEV-FEG: Microscópio Eletrônico de Varredura de Efeito de Campo

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Determinação da CIM por microdiluição para Anfotericina B e Itraconazol para os isolados do Complexo *Paracoccidoides spp* 40

Tabela 02: Determinação da CIM das Chalconas, para o, isolado Pb18. 42

Tabela 03. Determinação da CIM das Chalconas, para o Isolado, Pb02. 42

Tabela 04. Determinação da CIM das Chalconas, para o Isolado Pb01. 43

Tabela 05: Determinação da CIM dos protocatecuatos, para o, isolado Pb18. 44

Tabela 06: Determinação da CIM dos protocatecuatos, para o, isolado Pb 02. 44

Tabela 07: Determinação da CIM dos protocatecuatos, para o, isolado Pb01. 45

Tabela 08: Avaliação do tamanho das partículas e do índice de polidispersão (PDI) do sistema nanoestruturado lipídico (SNL) e das substâncias incorporadas nele. 52

Tabela 09: Avaliação de pontencial zeta do sistema nanoestruturado lipídico (SNL) e das substâncias incorporadas nele. 55

Tabela 10: Determinação da CIM das chalconas e protocatecuatos incorporadas no sistema naoestruturado lipídico (SNL), para o Isolado Pb18 60

Tabela 11. Determinação da CIM das chalconas e protocatecuatos incorporadas no sistema naoestruturado lipídico (SNL), para o Isolado Pb02 61

Tabela 12. Determinação da CIM das chalconas e protocatecuatos incorporadas no sistema naoestruturado lipídico (SNL), para o Isolado Pb01 61

Tabela 13. Tabela comparativa da determinação da CIM das moléculas derivadas de chalconas e protocatecuatos e das mesmas incorporadas no sistema nanoestruturado (SNL). 64

Tabela 14. T Tabela comparativa do IS (índice de seletividade) das moléculas derivadas de chalconas e protocatecuatos e das mesmas incorporadas no sistema nanoestruturado(SNL). 65

Tabela 15. Concentração de proteínas totais da cepa Pb 18 sob condições tratada com a substancia sintética 2-hidroxichalcona (2-chalc) e a mesma incorporada no sistema nanoestruturado 73

Tabela 16. Seleção de 10 *spots*, baseados na literatura sugerindo que proteínas estariam envolvidas entre os vários mecanismos de ação, baseados no peso molecular (MW) e nos pontos isoelétricos 77

Tabela 17. Proteínas diferencialmente expressas pela cepa *(*Pb18), separadas por eletroforese bidimensional e analisadas por espectrometria de massas MALDI TOF TOF. 83

Tabela 18. Proteínas diferencialmente expressas pela cepa (Pb18) tratada com 2-hidroxichalcona (2-chalc), separadas por eletroforese bidimensional e analisadas por espectrometria de massas MALDI TOF TOF. 86

Tabela 19. Proteínas diferencialmente expressas pela cepa, *(*Pb18) tratada com o sistema nanoestruturado com a 2-hidroxichalcona (SN+2-chalc) separadas por eletroforese bidimensional e analisadas por espectrometria de massas MALDI TOF TOF. 90

Tabela 20. Quadro comparativo das proteínas diferencialmente expressas pela cepa, *(*Pb18) tratada com 2-hidroxichaolcona (2-chalc) e o sistema nanoestruturado com a 2-hidroxichalcona(SN+2-chalc). 94

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Estrutura molecular das chalconas 11
Figura 02: Estrutura molecular dos protocatecuatos 13
Figura 03. Esquema representativo de uma nanoemulsão e um uma nanoparticula lipídica solida 17
Figura 04. Esquema representativo de uma microemulsão 18
Figura 05. Esquema representativo de um liposoma simple. 19
Figura 06. Determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) por microdiluição contra o Isolado de *Paracoccidioides ssp.* 40
Figura 07. Determinação da CIM para o solvente DMSO para isolado de *Paracoccidioides spp* 41
Figura 08. Viabilidade Celular frente à linhagem frente à linhagem celular de pneumócitos humanos normais (MRC5) da anfotericina e itraconazol. 46
Figura 09. Porcentagem de Viabilidade Celular, frente à linhagem celular de queratinócito bucal, (NOK) das diferentes chalconas (4'-Chalc, 2'-Chalc, 2-Chalc, 2.5-Chalc), determinados pelo método do MTT. 47
Figura 10. Porcentagem de Viabilidade Celular, frente à linhagem celular de queratinócito bucal, (NOK) das diferentes chalconas, determinado pelo método do SRB. 48
Figura 11. Porcentagem de Viabilidade Celular frente à linhagem celular de pneumócitos humanos normais (MRC5) dos diferentes protocatecuatos. 49
Figura 12. Porcentagem de Viabilidade Celular frente à linhagem celular de pneumócitos humanos Cancerigenas (A549) dos diferentes protocatecuatos. 50
Figura 13. Mostra a porcentagem de Viabilidade Celular frente à linhagem celular de queratinócito bucal, (NOK) dos diferentes protocatecuatos. 51
Figura 14. Efeito do tamanho de partícula do sistema nanoestruturado SNL média de 10 determinações. 52
Figura 15. Efeito do tamanho de partícula da SNL+2-chalc, média de 10 determinações. 53
Figura 16. Efeito do tamanho de partícula da SNL+anfotericina B, média de 10 determinações. 53
Figura 17. Efeito do tamanho de partícula da SNL+dodecila, média de 10 determinações. 54

Figura 18. Efeito do tamanho de partícula da SN+2'-chalc, média de 10 determinações. 54

Figura 19. Efeito do tamanho de partícula da SNL+decila, média de 10 determinações. 55

Figura 20. Fotomicrografia de campo de varredura de emissão de microscopia eletrônica para da SNL (Sistema Nanoestruturado Lipídico**)**, com um aumento x 70,000, visão panorâmica. 56

Figura 21. Fotomicrografia de campo de varredura de emissão de microscopia eletrônica para da SNL+ 2-chalc, com um aumento x 300, visão panorâmica. 57

Figura 22. Fotomicrografia de campo de varredura de emissão de microscopia eletrônica para da SNL+ 2-chalc, com um aumento x 95,000, isolando uma partícula. 57

Figura 23. Fotomicrografia de campo de varredura de emissão de microscopia eletrônica para da SNL+ dodecila, com um aumento x 40, visão panorâmica. 58

Figura 24. Fotomicrografia de campo de varredura de emissão de microscopia eletrônica para da SNL+ dodecila, com um aumento x 170,000, isolando as partículas. 58

Figura 25. Fotomicrografia de campo de varredura de emissão de microscopia eletrônica para da SNL+ decila, com um aumento x600, visão panorâmica. 59

Figura 26. Fotomicrografia de campo de varredura de emissão de microscopia eletrônica para da SNL+ decila, com um aumento x 120,000, isolando uma partícula. 59

Figura 27. Análise confirmatória da inibição da CIM através do (*In Cell Analyser GE*), para Pb18 com SNL+anfotericina B e com as substâncias incorporadas no nanocarreador SNL+2-chalc e SNL+dodecila. 63

Figura 28. Porcentagem de viabilidade celular frente à linhagem celular de queratinócito, (HaCaT) do SNL diluentes (DILLT1 e LT2). 67

Figura 29. Porcentagem de viabilidade celular frente à linhagem celular de pneumócitos humanos normais (MRC5) da anfoterecina B (anfo) e SNL+ anfoterecina B (SNL +anfo). 67

Figura 30. Porcentagem de viabilidade celular frente à linhagem celular de pneumócitos humanos normais (MRC5) do SNL, SNL+ chalconas e SNL+ protocatecuatos. 68

Figura 31. Curva de Adesão da matriz Fibronectina na 1h, 3h e 5h os resultados são expressos em N° de Células $X10^3$. 69

Figura 32. Curva de Adesão da matriz laminina 1h, 2h,3h e 5h. Os resultados são expressos em N° de Células $X10^3$, (p>0,05), os experimentos foram realizados em triplicata. 69

Figura 33. Expressão da capacidade Anti-adesiva do *P. brasiliensis* (Pb18) expresso em % da molécula 2-chalcona e dodecila (aderidas na matriz fibronectina). 71

Figura 34. Expressão da capacidade de Anti-adesiva *P. brasiliensis* (Pb18) expresso em % da SNL +2-chalcona aderidas na matriz fibronectina. 72

Figura 35. Eletroforese bidimensional dos componentes proteicos totais do isolado *P. brasiliensis* Pb 18 (A) fungo sem tratamento, (B) fungo tratado com a molécula antifúngica 2 hidroxichalcona e a mesma incorporada no sistem (SNL+2hidroxichalcona) **(C).**.. 74

Figura 36. Análise e seleção de alguns spots representativos obtidos por eletroforese bidimensional dos componentes protêicos totais da cepa *P. brasiliensis* Pb 18. 75

Figura 37. Distribuição das proteínas identificadas da cepa Pb18, separadas por eletroforese bidimensional e seqüenciadas por MALDI-TOF/TOF. Na categoria funcional. 78

RESUMO

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica humana geograficamente limitada à América Latina. *Paracoccidioides brasiliensis e P. lutzii* são seus agentes etiológicos. A anfotericina B, itraconazol e fármacos sulfamídicos são utilizados para tratar esta doença, entretanto estes antifúngicos produzem toxicidade com o uso prolongado. As limitações dos antifúngicos atuais nas terapias de longa duração, bem como o aumento da incidência de infecções fúngicas sistêmicas ressaltaram a necessidade de descobrir e desenvolver novos medicamentos. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito antifúngico de chalconas e de protocatecuatos incorporados em sistema nanoestruturado lipídico (SNL) contra *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. A metodologia preconizada M27 -A2 (2002) do CLSI foi aplicada com adaptações para as espécies filogenéticas *P. brasiliensis* S1, S2 Pb18, Pb 02 e *P. lutzii*, Pb01-like. Os valores de CIM para as chalconas variaram de 31,25 a 0,12 μg/mL e para os protocatecuatos de 7,8 a 0,24 μg/mL. Os melhores valores de CIM contra os isolados de *Paracoccidioides* sp foram 0,12 μg/mL para a 2-hidroxichalcona (2-chalc) e para o protocatecuato de dodecila (dodecila) 0,24 μg/mL. Também foi avaliada a citotoxicidade através do método de MTT e sulforodamida B para a determinação da viabilidade celular (MRC5, NOK, A549 e HaCaT), frente as substâncias. A viabilidade celular para as chalconas variou de 77% a 97% e para os protocatecuatos de dodecila de 70% a 98%, sendo os melhores resultados para (2-chalc) com 97% e para o dodecila com 98%. A partir destes dados foram obtidos os índices de seletividade (IS) de 139 e 37,7, para (2-chalc) e o dodecila respectivamente. O SNL foi desenvolvido, avaliado e posteriormente foram incorporadas a 2-chalc e a dodecila. Através da caracterização físico química, realizada pelo analizador de partículas ZetaSizer Nano-ZS, foi mostrada que o potencial zeta variaram de -55 a -68 e o diâmetro das partículas que variaram de 148 a 156 nm. O índice de polidispersão (PDI) foi analizado e o valor obtido foi de 0,12 em média, mostrando que o sistema foi estável, homogênio e em escala nano. Desta forma foi avaliada a atividade antifúngica das substâncias incorporadas em SNL potencializando em 4 a 60 vezes a CIM, chegando a 100% a viabilidade celular e aumentando os IS de 3 a 100 vezes dependendo da substância. Posteriormente foi verificada a atividade dos protótipos antifúngicos selecionados no processo de adesão às matrizes laminina e fibronectina do isolado Pb18. Os resultados mostraram que a adesão foi inibida 51% e 67% para 2-chalc e dodecila respectivamente, sendo que após a incorporação destas no SNL essa porcentagem aumentou em aproximadamente 20% obtendo valores maiores que 80% de inibição da adesão. A melhor atividade anti-adesiva ocorreu com a dodecila nos ensaios de ligação à laminina. Para verificar o efeito dos protótipos antifúngicos incorporados e não incorporados no SNL realizou-se a análise sobre o proteôma total do fungo tratado e não tratado a fim de identificar as proteínas diferencialmente expressas e assim o provável mecanismo de ação. Inicialmente foi verificado o perfil total de proteínas do isolado Pb18 (S1) por eletroforese 2D e foram selecionados 240 spots diferencialmente expressos. Foi realizado o sequenciamento através MALDI TOF/TOF, onde se identificaram 80 proteínas que foram categorizadas na sua maioria relacionadas à funções metabólicas, produção de energia, ciclo celular e de membrana ligadas ao processo de adesão e essenciais para a sobrevivência do fungo. Desta forma podemos concluir que as chalconas e os protocatecuatos em especial a 2-chalc e dodecila possuem uma alta atividade antifúngica, baixa citotoxicidade, altos índices de seletividade que foram potencializados quando foram incorporados no SNL, tormando-se excelentes protótipos antifúngicos para o tratamento da paracoccidioidomicose.

Palavras chaves: Paracoccidioidomicose, chalconas, protocatecuatos, Sistema Nanoestruturado Lipídico.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a geographically limited to Latin America human systemic mycosis. *Paracoccidioides brasiliensis* and *P. lutzii* are etiological agents. A amphotericin B, itraconazole and sulfamidic drugs are used to treat this disease, however these antifungals produce toxicity with prolonged use. The limitations of current antifungal therapies in long duration as well as the increased incidence of systemic fungal infections emphasized the need to discover and develop new medicines. The purpose of this study, the antifungal effect of chalcones and protocatechuates incorporated into nanostructured lipid system (SNL) was investigated against *P. brasiliensis and P. lutzii*. The methodology proposed M27-A2 (2002) CLSI was applied with adaptations to the phylogenetic species *P. brasiliensis* S1, S2 Pb18, Pb 02 and *P. lutzii*, Pb01-like. MIC values for chalcones ranged from 31.25 to 0.12 μg/mL and the protocatechuates of 7.8 to 0.24 μg/mL. The best MIC values against *Paracoccidioides spp* isolates were 0.12 μg/mL to 2-hydroxychalcone (2-chalc) and the protocatechuate of dodecyl (dodecyl) 0.24 μg/mL. Cytotoxicity was also assessed by MTT method and sulphorodamide B for determination of cell viability (MRC5, NOK, HaCaT and A549) compared substances. Cell viability for chalcones ranged from 77% to 97% and for the protocatechuates of 70% to 98%, with the best results for (2-chalc) with 97% and 98% to dodecyl. From these data the selectivity index (SI) of 139 and 37.7 were obtained for (2-chalc) and dodecyl respectively. The SNL was developed, evaluated and subsequently were incorporated into 2-chalc and dodecyl. Through the physicochemical characterization performed by the analyzer Zetasizer Nano-ZS particles was shown that the zeta potential ranging from -55 to -68, and the diameter of the particles ranging 148-156 nm. The polydispersity index (PDI) was analyzed and the value obtained was 0.12 on average, indicating that the system was stable, homogeneous and nanoscale. Thus we evaluated the antifungal activity of substances incorporated into SNL leveraging in 4 to 60 increase the MIC, reaching 100% cell viability and increasing IS 3 to 100 depending on the substance. Subsequently we investigated the antifungal activity of prototypes selected in adherence to fibronectin and laminin matrices isolate Pb18 process. The results showed that the adhesion was inhibited 51% and 67% for 2- chalc and dodecyl respectively, and after the incorporation of these on SNL this percentage increased by approximately 20% obtaining values greater than 80% inhibition of adhesion. The best anti-adhesive activity occurred with dodecyl in binding assays to laminin. To evaluate the effect of incorporated and unincorporated antifungal prototypes on SNL was performed the analysis on the total proteome of treated and untreated yeast to identify proteins differentially expressed and thus the likely mechanism of action. It was initially verified the total protein profile of the isolate Pb18 (S1) by 2D electrophoresis and 240 differentially expressed spots were selected. Sequencing by MALDI TOF/TOF, where they identified 80 proteins that were categorized mostly related to metabolic functions, energy production, cell cycle and membrane linked to the accession process and essential for the survival of the fungus. Thus we conclude that chalcones and protocatechuates in particular 2-chalc and dodecyl have a high antifungal activity, low cytotoxicity, high levels of selectivity which were potentiated when they were incorporated in the SNL becoming prototypes excellent antifungal for the treatment of paracoccidioidomycosis.

Keywords: Paracoccidioidomycosis, chalcones, protocatechuates, Nanostructured Lipid System.

Capitulo 1

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia e Taxonomia

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença granulomatosa sistêmica de grande importância em nosso meio, dado a sua frequência, a gravidade de algumas de suas formas anátomo-clínicas e as taxas de mortalidade (LACAZ, 1994; BENARD; MENDES GIANNINI, 2009). A doença é geograficamente limitada à América Latina, desde o México até a Argentina, com prevalência em países da América do Sul (RESTREPO et al., 2001). Dados estatísticos indicam que cerca de 10 milhões de pessoas que vivem em regiões endêmicas já entraram em contato com o fungo (SAN-BLAS et al., 2002). Mostrando alta prevalência em Brasil, Colômbia, Venezuela e Argentina (BRUMMER, et al., 1993; BOCCA, et al., 2013) e Alguns casos foram registrados nos EUA, Europa e Ásia. (BUITRAGO, et al, 2011).

Entre 1980 e 1995, a PCM destacou-se como a oitava causa de mortalidade por doenças infecciosas e parasitárias de caráter crônico e apresentou a mais elevada taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas no Brasil sendo 80% dos casos de pacientes notificados as maiores taxas de mortalidade por ano ocorreram nas regiões Sudeste e Sul, especificamente em São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Rio Grande do Sul (PRADO et al., 2009). Foram observados dados referentes a outras regiões, como Norte, Nordeste e Centro-Oeste, nas quais os estados mais afetados foram Rondônia, Pará, Bahia, Maranhão, Mato Grosso do Sul e Goiás (COUTINHO *et al*., 2002). Sendo a maior causa de mortalidade das micoses sistêmicas no Brasil e a oitava causa mais importante de mortalidade de doenças infecciosas crônicas, causando 1,65 mortes por 106 habitantes (COUTINHO, et al., 2002; BOCCA, et al., 2013).

Embora os dados já relatados, seu impacto na saúde pública não foram completamente avaliadas devido à falta de dados disponíveis Porque notificação de casos não é obrigatório a nível nacional nível. (HOLETZ, et al., 2002) Apesar ser endêmica, cerca de 100 anos após a sua descoberta, há apenas estimativas da incidência da doença que variam desde 1 a 3 novos casos por 100.000 habitantes em áreas endêmicas. (SHIKANAI-YASUDA et al., 2011) As taxas de mortalidade atribuídas à PCM torná-lo possível estimar que 3.360 novos casos ocorram anualmente no Brasil.

Com base em recentes análises filogenéticas, *P. brasiliensis* está classificado na Ordem Onygenales, na Família Ajellomycetaceae, formando um grupo monofilético que inclui os gêneros *Blastomyces, Emmonsia* e *Histoplasma* (UNTEREINER et al., 2004). (MATUTE et al., 2006), classificaram este fungo em três diferentes espécies filogenéticas, S1, PS2 e PS3 sendo a espécie S1, um grupo parafilético encontrado no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela, a espécie PS2, um grupo monofilético encontrado no Brasil e PS3 encontrada na Venezuela e um grupo monofilético encontrado apenas na Colômbia Todas as três espécies são capazes de induzir doença em seres humanos e tatus. (CARRERO, et al., 2008).

Os 21 isolados de *P. brasiliensis* foram classificados dentro de duas espécies filogenéticas, S1 e PS3, anteriormente descritas por MATUTE *et al.*(2006), que além de classificar o isolado Pb01 separado dos demais, os classificaram como uma nova espécie filogenética, existem estudos de 88 isolados, foram identificados, 17 pertencentes ao grupo de Pb01 assim se estimou que as espécies filogenéticas S1/PS2/PS3 e Pb01 tiveram um ancestral comum a cerca de 32 milhões de anos atrás, e por meio de análises de recombinação sugeriram a existência de isolamento reprodutivo entre estas espécies e por isso propuseram que o isolado Pb01 como uma nova espécie, *P. lutzii* (TEIXEIRA et al., 2009).

A PCM ativa acomete mais frequentemente trabalhadores rurais adultos do sexo masculino, sendo a proporção homem: mulher de aproximadamente 13:1 (BRUMMER *et al*., 1993) e podendo variar entre 4:1 em áreas endêmicas no Brasil e 15:1 na Colômbia, Equador e Argentina (BORELLI, 1972).

Em estudos realizados no serviço de anatomia patológica do hospital Araújo Jorge no período de 2000 a 2006 foi verificado 77 casos, sendo que na distribuição por sexo obteve-se uma proporção de 18:1, corroborando com os dados descritos na literatura, na qual o sexo masculino foi o mais acometido pela patologia quando comparado ao feminino, sendo 95% (73/77) e 5% (4/77), respectivamente. (CAMPOS; PADOVANI; CATANEO., 1991; FERREIRA et al., 2012).

A diferença entre os sexos não existe nas infecções subclínicas pelo *P. brasiliensis* ou na PCM ativa entre indivíduos pré-púberes, sugerindo que as mulheres adultas possuem um mecanismo natural de defesa contra a progressão da doença. Este fato se deve à presença do17 β-estradiol no citoplasma, este inibe a transformação de micélio para levedura *in vitro* isto não acontece com a testosterona (CLEMONS et al., 1989; VARGAS; VARGAS, 2009).

Esta doença tem como principal agente etiológico o *Paracoccidioides brasiliensis* que é um fungo dimórfico que cresce na fase miceliana (M), saprobiótica, em temperaturas de 25 a 27 ºC, sob a forma de colônias cotonosas e esbranquiçadas. Em meios enriquecidos a 37 ºC desenvolve-se a fase leveduriforme (L) que constitui a forma parasitária do fungo, apresentando-se múltiplas células arredondadas, pequenas aderentes a uma célula circular maior de parede dupla, sugerindo distribuição característica de "roda de leme" ou de rato mickey característicos e com tamanhos variados, algumas em gemulação, com estruturas fúngicas semelhante às encontradas nos tecidos (LACAZ, 1994; SAN-BLAS et al., 2002; ALVES 2013).

Adesão microbiana e fúngica aos tecidos do hospedeiro é o evento inicial do processo infeccioso (PATTI et al., 1994; NOGUEIRA al., 2010). A interação com a matriz extracelular (MEC) tem sido correlacionada com a capacidade invasiva de organismos diferentes (LIMA et al., 2001).

1.2. Patogênese

A infecção humana por *P. brasiliensis* ocorre principalmente pelo sistema respiratório, por meio da inalação de conídios da forma filamentosa do fungo (forma infectante). Os conídios transformam-se em formas leveduriformes (forma parasitaria) nos alvéolos pulmonares sob estímulo do aumento da temperatura, induzindo uma resposta do hospedeiro, caracterizado por um complexo clínico chamado de infecção primária em geral assintomática seguido pela formação de um granulo que pode permanecer "adormecido" durante anos, pois o fungo tem a capacidade de permanecer quiescente no pulmão por tempo indeterminado, de acordo com a resposta imune do hospedeiro. (RESTREPO et al., 1981; BORGES et al., 2002; CAMARGO et al., 2000; VARGAS 2009).

As manifestações clínicas se iniciam quando a doença se desenvolve, podendo ficar contida nos pulmões ou disseminar-se para outros órgãos ou sistemas por meio da via hematogênica e/ou linfática, causando lesões secundárias (FRANCO et al., 1986). Pode-se manifestar com tosse seca, com uma produção progressiva de secreções e dispneia durante a atividade física, os pulmões, vias aéreas superiores, os gânglios linfáticos, pele, mucosa oral, glândulas suprarrenais e do trato digestivo são frequentemente afetados. (MENDES; REIS; TAVARES, 2007; ABREU et al., 2013).

A PCM apresenta-se sob duas formas clínicas. Aguda/Subaguda e Crónica (SHIKANAI et al., 2006; MAYAYO et al., 2007; ALVES et al., 2013). A forma Aguda/Subaguda (Juvenil) representa 3-5% dos casos e surge em crianças e adolescentes. Tem uma evolução rápida de 4-12 semanas e os doentes apresentam febre, astenia, emagrecimento e anemia, linfadenomegalias e hepatoesplenomegalia, leucocitose e eosinofilia, e supuração de massa ganglionar cervical. As manifestações pulmonares estão presentes em 90% dos pacientes.

A Forma Crônica (Adulto) surge em 90% dos casos de PCM, em doentes com idades compreendidas entre os 30 e os 50 anos (SHIKANAI et al. 2006). É mais frequente no sexo masculino. Nestes casos, o período de latência é de décadas, com provável infecção na infância. O envolvimento pulmonar é frequente. Podem ser únicas ou múltiplas e localizadas em qualquer parte do tegumento e/ou mucosas, no entanto, encontram-se mais frequentemente na face e mucosa oral.

Podem surgir sob a forma de pápulas ou nódulos dolorosos que coalescem levando a ulceração ou surgir como lesões granulomatosas ou vegetantes. O envolvimento pulmonar ocorre em cerca de 80% dos doentes e, na sua maioria, é subclínico. Os achados pulmonares mais frequentes são enfisema e/ou fibrose pulmonar. Pode haver disseminação da doença, com envolvimento ganglionar, visceral, ósseo e/ou cerebral. (ALVES et al., 2013).

1.2.1. Moléculas de Adesinas de *Paracoccidioides sp*

A matriz é uma rede tridimensional de proteínas como colágeno, glicoproteínas não-colagênicas, principalmente fibronectina e laminina, e proteoglicanos. Após a adesão, o próximo passo deve ser o de superar as barreiras impostas pelos tecidos epiteliais e MCE. A atividade proteolítica das diferentes proteases tais como plasmina, tem-se mostrado importante durante o processo de muitos tipos de infecções (WALKER et al., 2005).

Acredita-se que *P. brasiliensis* deve atuar através de mecanismos que lhe conferem capacidade de aderir, invadir e atravessar barreiras impostas pelos tecidos do hospedeiro (MENDES-GIANNINI, TAYLOR et al., 2000) sintetizando várias substâncias que participam direta ou indiretamente da relação parasito-hospedeiro.

P. brasiliensis é considerado um fungo intracelular facultativo, podendo aderir e invadir células epiteliais *in vivo* e *in vitro* (MENDES-GIANNINI, TAYLOR et al., 2000). A capacidade de aderência e invasão do fungo é dependente da virulência do mesmo (HANNA, MONTEIRO DA SILVA et al., 2000).

P. brasiliensis também apresentou em sua superfície celular duas proteínas com massas moleculares de 19 e 32 kDa que interagem com diferentes proteínas da MEC, tais como laminina, fibronectina e fibrinogênio (GONZÁLEZ et al., 2005). Ensaios utilizando conídios de *P. brasiliensis*, pré-incubados com anticorpo monoclonal anti-32 kDa inibiram, de modo concentração-dependente, a aderência do fungo as proteínas da MEC (GONZÁLEZ *et al.*, 2005; HERNANDEZ *et al.*, 2011).

A proteína gliceraldeído-3-fosfato dehidrogenase (GAPDH) de *P. brasiliensis* foi capaz de se ligar à laminina, colágeno I e fibronectina. O tratamento de formas leveduriformes de *P. brasiliensis* com anti-GAPDH e de pneumócitos com GAPDH recombinante promoveu a inibição da infecção do fungo às células epiteliais (BARBOSA et al., 2006).

A Gp43 foi a primeira a ser identificada como um ligante para a laminina e fibronectina (HANNA et al 2000., ANDRÉ et al., 2004). A 43 kDa glicoproteína mostrou desempenhar um papel na adesão, porque anti gp43 do soro inibiu o processo de adesão de 85 % (HANNA et al., 2000; DA SILVA NETO et al., 2009; BORGES et al., 2011; DA SILVA J et al., 2013).

Triosefosfato isomerase (TPI) é uma enzima catalisadora a conversão de fosfato de dihidroxi acetona (DHAP) para gliceraldeído-3-fosfato (G3P). A proteína estava bem caracterizada em *P. brasiliensis* por análise Imuno proteômica, que foi originalmente descrita em nosso laboratório como um (FONSECA et al., 2001; PEREIRA et al., 2007). Esta se liga preferencialmente a laminina, ligante importante na adesão (PEREIRA et al., 2007).

Castro et al (2005) realizaram um *screening* das proteínas GPI (Glicosilfosfatidil-inositol) ancoradas no fungo formando ligação covalente. Também Fazem parte das proteínas para a célula glucanas de parede, ligante da matriz extracelular. Tomazett et al (2005) Recentemente uma nova proteína-GPI definida como âncora de β-1,3-glucana através de β-1,6-glucana, predita de *P. brasiliensis* foi clonada em *Pichia pastoris*, analisada diferencialmente e imunolocalizada nas duas formas deste fungo, presente na superfície das células mãe e não em brotos, sugerindo estar presente na morfogênese, especificamente no processo de filamentação e talvez na adesão à matriz extracelular, na organização da parede celular.

Em estudo realizado por Andreotti et al. (2005), uma adesina de 30 kDa ligante de laminina, foi caracterizada através de sequenciamento de aminoácidos, mostrando que esta é

uma proteína 14-3-3 envolvida na adesão de *P. brasiliensis*. Estas se ligam em mais de 150 diferentes proteínas e atuam na regulação de muitos processos celulares. (FU et al., 2000). Interações entre integrinas e proteínas 14-3-3 também foram identificadas, sugerindo uma importante função desta proteína na regulação da adesão celular (DA SILVA et al., 2013).

Nosso grupo de pesquisa identificou adesina 30 kDa identificada como um 14-3-3 por análise de espectrometria de massa. Pertence a família de proteína de 14-3-3 que é um grupo pequeno de proteínas ácidas que têm sido implicados numa variedade de processos celulares em eucariotas. No entanto, estas proteínas estão envolvidas em apoptose, a transdução de sinal, regulação do ciclo celular e transcrição, o papel exato nestes processos permanece desconhecido (FU et al., 2000; DA SILVA et al., 2013).

Outra adesina importante é a enolase de *P. brasiliensis* esta relacionada com a sua capacidade de se ligar ao plasminogênio e fibronectina, tal como descrito por Nogueira et al. (2010) e Donofrio et al. (2009). Os resultados apresentados pelo nosso grupo fornecem evidências para múltiplas localizações subcelulares é uma enzima glicolítica; com uma função primária, que é predominantemente localizada no citoplasma, onde pode ser livre ou associada com o citoesqueleto e outras enzimas glicolíticas, podendo atuar como uma proteína transmembrana de superfície. É demonstrado que a hemoglonina induz alguns ligantes para receptores específicos da MEC sobre *C. albicans*, e o crescimento induz a ativação dos componentes da MEC, incluindo colágeno IV fibronectina, fibrinogênio, laminina. (YAN et al., 1998, MARCOS et al., 2012).

Outros compostos de *P. brasiliensis* também foram estudados em relação a sua capacidade de produzir resposta imunológica em hospedeiros, entre estas proteínas foram descritas as de 57, 48 e 45 kDa (CASOTTO, 1990; FERREIRA-DA-CRUZ, *et al.*, 1992), uma proteína recombinante de 27 kDa (ORTIZ et al., 1996; GARCÍA et al., 2011) e um antígeno circulante de 87 kDa que revelou homologia com proteínas de choque térmico (Hsp) de vários organismos (DÍEZ, S. et al., 2002).

Assim como seis componentes proteicos sintetizados preferencialmente na fase leveduriforme de *P. brasiliensis* foram identificados, como altamente homólogos a frutose-1,6-bifosfato, aldolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, malato desidrogenase (DA FONSECA et al., 2001; CARNEIRO et al., 2005; BARBOSA, et al., 2006; PEREIRA et al., 2007; DA SILVA NETO, DE FÁTIMA DA SILVA et al., 2009).

Neste contexto as moléculas citadas como adesinas deste fungo são importantes alvos para o desenvolvimento de agentes antifúngicos, bem como de novas estratégias que afetem a

interação fungo-hospedeiro, para um tratamento mais eficiente em micoses sistêmicas. Assim neste estudo ainda pretendemos buscar novos alvos que possam estar relacionados à adesão do fungo passo inicial e crucial para a invasão e consequentemente o estabelecimento da infecção.

1.3. Tratamento

O tratamento empregado em PCM inclui antibióticos e quimioterápicos (origem sintética). Vários antifúngicos podem ser utilizados para o tratamento desses pacientes, tais como anfotericina B, sulfamídicos (sulfadiazina, associação sulfametoxazol/trimetoprim), azólicos (cetoconazol, fluconazol, itraconazol).

Apesar da limitação das informações disponíveis em estudos comparativos com diferentes esquemas terapêuticos, sugere-se o itraconazol como a opção terapêutica que permitiria o controle das formas leves e moderadas da doença em menor período de tempo.

Entretanto, considerando que o medicamento não está disponível na rede pública da maioria dos Estados, a combinação sulfametoxazol-trimetroprim é a alternativa mais utilizada na terapêutica ambulatorial dos pacientes com PCM. Pacientes com formas graves, necessitando internação hospitalar, devem receber anfotericina B ou associação sulfametoxazol/ trimetoprim por via intravenosa segundo o consenso em paracoccidioidomicose. **(**SHIKANAI et al., 2006).

Anfotericina B é um polieno sua ação está relacionada ao anel macrolídico, o qual apresenta característica hidrofóbica e se liga aos esteróis, principalmente ao ergosterol da membrana celular fúngica.

A molécula também se liga ao colesterol da membrana plasmática humana, o que explica o potencial tóxico da anfotericina B. Com a ligação do fármaco ao ergosterol ocorre uma alteração na permeabilidade seletiva da célula fúngica permitindo a saída de nutrientes fundamentais para a célula como água, sais, açúcares e proteínas, causando assim uma deterioração metabólica e consequentemente morte celular.

A administração da anfotericina B deve ocorrer por meio da via endovenosa e em forma de desoxicolato, pelo fato desta droga apresentar baixa absorção gastrointestinal (SOKOL-ANDERSON, BRAJTBURG *et al.*, 1986).

A toxicidade da anfotericina B está diretamente relacionada aos rins, pois diminui o fluxo glomerular em até 80 % causando uma vasocontrição local. Também apresenta mielotoxicidade podendo causar anemia em decorrência de uma alteração na produção de eritropoetina por atuar diretamente na medula óssea (CATALÁN, MONTEJO, 2006).

É ainda o primeiro fármaco de escolha para essa e outras micoses endêmicas para a forma mais grave da doença que podendo assim trazer risco de morte, independentemente do estado imunológico do paciente.

No entanto, o uso prolongado destes fármacos pode causar toxicidade e dificulta a terapia nessas infecções severas nos pacientes com formas graves de PCM, com perda de peso > 10%, associada à dificuldade de deglutição e comprometimento do estado geral, insuficiência respiratória, sinais ou sintomas neurológicos ou evidências de comprometimento de adrenais, devem preferencialmente realizar o tratamento em regime hospitalar.

A palavra cura talvez nunca possa ser aplicada ao pacientes portadores de PCM pela impossibilidade de erradicação de *P. brasiliensis*. Os pacientes apresentam o risco potencial de uma reativação tardia, motivo pelo qual se emprega o termo "cura aparente ou cura clínica". As diferentes modalidades terapêuticas diminuem a quantidade de fungos no organismo, permitindo a recuperação da imunidade celular e restabelecendo o equilíbrio entre parasito e hospedeiro. (SHIKANAI et al., 2006).

Por este motivo, após a interrupção do tratamento uma vez observado os critérios de cura, os pacientes devem ser acompanhados ambulatorialmente, uma vez ao ano, com exame clínico e sorológico, se necessário. A positivação ou aumento do valor do título da reação de imunodifusão dupla pode preceder a recaída clínica. Portanto, frente a esta situação está justificada a reintrodução da terapêutica antifúngica e o acompanhamento do paciente sempre segundo o consenso em paracoccidioidomicose.

Assim o acompanhamento após o tratamento é essencial já existe um risco potencial de reativação da doença por esta razão nos últimos anos, novos agentes antifúngicos tornaram-se disponíveis, resultando em uma mudança no padrão de cuidado para muitas destas infecções.

No entanto, ainda existem algumas limitações dos atuais agentes antifúngicos, além do rápido surgimento de resistência medicamentosa e de que a letalidade causada por alguns fungos, como *P. brasiliensis*, por ser considerada progressiva e pela possibilidade da reativação tardia da PCM pôs em evidência a real necessidade da utilização de novas estratégias terapêuticas e preventivas, além da descoberta de novos agentes antifúngicos, de preferência com mecanismos de ação inovadores (BABU, LI et al., 2006; PERLROTH, CHOI et al., 2007).

Pela toxicidade dos agentes antifúngicos com o uso prolongado, assim como pela resistência medicamentosa, nosso interesse em pesquisar novas substâncias com potencial antifúngico de origem natural.

1.4. Antifúngicos de origem natural

Pesquisas que envolvem a bioprospecção a partir de fontes vegetais podem se basear em informações etnofarmacológicas e quimiosistemáticas assim como nas tendências atuais da pesquisa de fármacos de origem natural. Estas são as alternativas viáveis, para a bioprospecção, de melhor relação custo-benefício para a descoberta de substâncias bioativas que sirvam de protótipos para o desenvolvimento de fármacos novos, especialmente pela diversidade de estruturas químicas, muitas vezes inéditas, que a pesquisa em produtos naturais vem fornecendo (KATO, 2001).

Com isso, a biodiversidade brasileira reveste-se de uma importância estratégica ímpar, principalmente para atividade de bioprospecção, que vem a ser exploração da diversidade biológica por aqueles recursos considerados de valor comercial e que, eventualmente, pode fazer uso do conhecimento de comunidades indígenas ou tradicionais (ASSAD, 2003).

Adicionalmente, por meio de nossa inserção no Projeto Temático – BIOTA/FAPESP (Bioprospecta), intitulado "Conservation and sustainable use of the plant biodiversity from Cerrado and Atlantic Forest: chemical diversity and prospecting for potencial drugs", e mais recentemente SISBIOTA CNPq, desenvolvido juntamente ao Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) do Instituto de Química – UNESP, tem-se estudado várias espécies vegetais, baseado em bioensaios prévios de prospecção de extratos, frações, substâncias com atividade antifúngica, por meio de metodologias aprovadas pelo CLSI (SCORZONI, BENADUCCI et al., 2007).

Uma atenção especial tem se voltado para derivados naturais, com base no conhecimento da produção de substâncias antifúngicas pela natureza (GURGEL et al., 2005). Com o passar do tempo, produtos naturais estão sendo cada vez mais utilizados na medicina (PARK et al., 1998a). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, plantas medicinais seriam as melhores fontes para obtenção de uma imensa variedade de fármacos (NASCIMENTO, et al., 2011).

Alguns estudos avançam para outras fases do desenvolvimento de protótipos antifúngicos como no trabalho de Johann, et al. (2010), onde *Schinus terebinthifolius* mostrou elevada atividade clinica contra isolados de *P. brasilienses*, demonstrando que há forte potencial de outras plantas que são comumente usadas na terapêutica medicinal brasileira, terem possibilidade de agirem como agentes contra *P. brasilienses*. ácidos gálicos foram relatados como potenciais moléculas antifúngicas contra *P. brasiliensis.*

O ácido gálico é uma substância que ocorre em muitas plantas, como raízes de *Paeonia rockii* (PICERNO et al., 2011), espécies de *Astronium* (DA SILVA et al., 2011),

frutos de *Syzygium cumini* (TOBAL et al., 2012), *Euphorbia lunulata* (YANG et al., 2011), folhas, caules e raízes de variedades diferentes de *Labisa pumila Benth* (KARIMI et al., 2011), *Zingiber officinale Roscoe* (GHASEMZADEH, et al., 2010), casca de *Klainedoxa gabonensis* (WANSI et al., 2010), e de *Nervilia aragoana* e *folhas de Atlantia monophylla* (REDDY et al., 2010*), Lawsonia inermis* (SULTANA et al., 2009), *Ardisia chinensis* (LI et al., 2006) e *Alchornea glandulosa* (CALVO et al., 2007).

Foi avaliado a atividade antimicrobiana de uma série de alcoóis de cadeia longa (alcanóis), sendo testados contra 15 microrganismos e a atividade máxima parece ser dependente do comprimento da cadeia hidrofóbica, e também do microrganismo testado. Os resultados obtidos com os alcoóis exibiram uma regra geral aplicável para muitos outros derivados de ácido gálico (KUBO, MUROI et al., 1995).

Também o *Baccharis* é um dos maiores gêneros da família *Asteraceae,* que inclui mais de 500 espécies que estão distribuídos essencialmente no sul e sudeste do Brasil, Uruguai, Paraguai, Argentina e Bolívia (FUKUDA et al., 2006). Várias espécies de *Baccharis* têm sido amplamente utilizadas na medicina popular para o tratamento e prevenção de anemia, diabetes e doenças de estômago, fígado e próstata (VERDI et al., 2005). Estudos prévios de espécies de plantas *Baccaris*, mostraram que a fracção de hexano das partes aéreas é ativo contra isolados clínicos de *P. brasiliensis*. Curiosamente, a fração hexano exibido valores (MIC) de concentração inibitória mínima variando 7,8-30 μg/ml, sem evidência de citotoxicidade de macrófagos (JOHANN et al., 2010).

Os extratos de todas as partes aéreas de *B. dracunculifolia* se observou que este extrato não era ativo contra *C. albicans* dois estudos mostraram que não houve diferenças nas atividades dos extratos *B. dracunculifolia* coletados em dois locais diferentes contra *C. albicans*. Curiosamente, o extrato hexánico foi ativa contra *C. tropicalis e C. glabrata* (a CIM foi de 250 e 1000 μg/ml, respectivamente) (JOHANN et al., 2010). Observaram que *Cryptococcus neoformans* foi suscetível a concentrações de 30 μg/ml deste extrato hexano. Já para os isolados *Paracoccidioides sp.* foram mais suscetíveis do que a espécie Cândida, mas os resultados foram semelhantes aos as de *C. neoformans* (JOHANN et al., 2010).

Alguns extratos de plantas medicinais com atividade antifúngica e antibacteriana foram pesquisados. Estudos mostraram a *Hyptis ovalifolia* e *Eugenia uniflora*, plantas provenientes do Cerrado brasileiro como ativas contra os dermatófitos, e *Trichophyton rubrum* foi o fungo mais suscetível (SOUZA et al., 2013).

Pelas evidências já relatadas temos o interesse em pesquisar novas substâncias com potencial antifúngico de origem natural com baixa toxicidade como o grupo das chalconas e dos protocatecuatos .

1.5. Chalconas

As chalconas são substâncias classificadas como flavonoides de cadeia aberta (com anel C ausente), obtidos de plantas observados na Figura 01. Destacam-se por apresentarem diversidade estrutural no reino vegetal e também grande variedade de atividades biológicas devido à presença de muitos compostos fisiologicamente ativos e por serem substratos para a realização de várias sínteses orgânicas. (SIMÕES et al., 2006; BRANDÃO 2010; BANDAY et al., 2011; KATSORI et al., 2011).

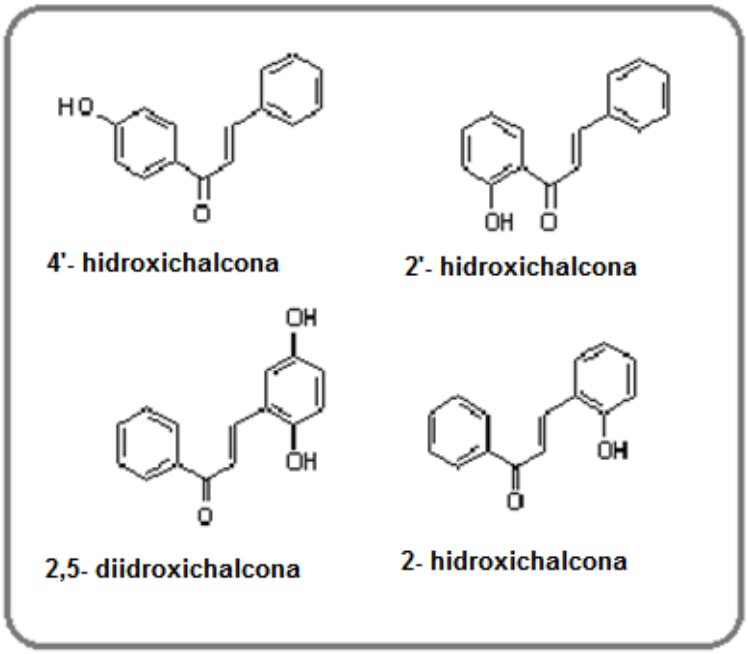


Figura 01. Estrutura química das chalconas.

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

O potencial de redução do processo inflamatório destas substâncias foi demonstrado em vários estudos com chalconas derivadas de plantas do gênero *Glycyrrhiza* e *Alpinia conchigera* (Zingiberaceae) (PRASAD et al., 2010). Alguns estudos relataram que chalconas isoladas de

plantas do gênero *Glycyrhiza*, apresenta forte atividade contra o protozoário *Leishimania* sp por inibir a enzima fumarato redutase (BOECK et al., 2006). Stevaz e colaboradores (2004) mostraram que há atividade de chalconas contra os fungos *Fusarium equiseti* e *Colletotrichum truncatum*.

A (Kamala) é um extrato vermelho preparado pela extração *Mallotus philippinensis* (SINGH et al., 2001), frutos inteiros não moídos nem esmagados de, uma nova chalcona dimérica , juntamente com os três compostos conhecidos 1 - (5,7-di-hidroxi-2,2,6-trimetil-2H-1-benzopirano-8-il)-3-fenil-2-propen-1-ona (2), rottlerin (3) e 40-hydroxyrottlerin. A kamala é usada na medicina popular contra infecções parasitarias da pele. *Mallotus philippinensis* tem revelado a presença de certos terpenos (BANDOPADHYAY et al., 1972; NAIR; MADHUSUDANA, 1993), e flavonoides (AHLUWALIA et al., 1988; NGUYEN et al., 2010a) lignanas, (NGUYEN et al., 2010b), chalconas e derivados dimericos de chalconas (TANAKA et al., 1998; FURASAWA et al., 2005).

As Chalconas obtidas pelo processo de extração do *Mallotus philippinensis*, foram avaliados quanto à atividade antifúngica contra diferentes leveduras patogênicos em humanos e fungos filamentosos. A atividade antiproliferativa contra o *Cryptococcus neoformans* PRL518, *C. neoformans* ATCC32045 e *Aspergillus fumigatus* respectivamente mostrou 54% de inibição do crescimento de células THP-1 as linhas de células quando infectadas com o fungo. (KULKARNI et al., 2013).

Sulfonas têm lhe conferido a forma versátil de blocos na síntese de compostos biologicamente ativos, (CARRENO, 1995; FRENANEZ, 2008) Muitos derivados de sulfona têm sido explorado em química orgânica sintética e medicinal (SANFRUTOS, 2010). Sulfona contendo moléculas amplamente utilizadas como drogas anti - inflamatórias. Recentemente, eles foram utilizados em sínteses totais e na geração de dados de funcionalização de compostos. Além disso, esses radicais têm potencial de estabilizar carbânions e agir como reagentes catiônicos. (NAJERA; SANSANO, 1998; CHINCHILLA; NAJERA, 1997). Estas chalconas sulfonadas têm limitações devido a baixo rendimento, e ao maior tempo de reação.

Em estudo estas substâncias foram avaliadas quanto à sua atividade antibacteriana e antifúngica foi demonstrado uma alta atividade antifúngica contra *C. albicans.* Mostrando uma melhor atividade antibacteriana contra *B. subtilis. S. typhimurium*. Outros derivados de sulfona mostraram uma atividade antibacteriana e antifúngica média. (KONDURU et al., 2013)

Park e colaboradores (2011) avaliaram a atividade de chalconas no efeito da gripe pelo vírus da influenza e como resultado foi observado uma baixa inibição do vírus, sendo um importante dado para desenvolvimento de derivados naturais contra o vírus.

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

1.6. Protocatecuatos

O ácido protocatecuico ou ácido 3,4- dihidroxibenzóico é um derivado do ácido benzóico encontrado em frutas, nozes e vegetais, tais como azeitonas e arroz (SOARES, 2002), observados na figura 02.

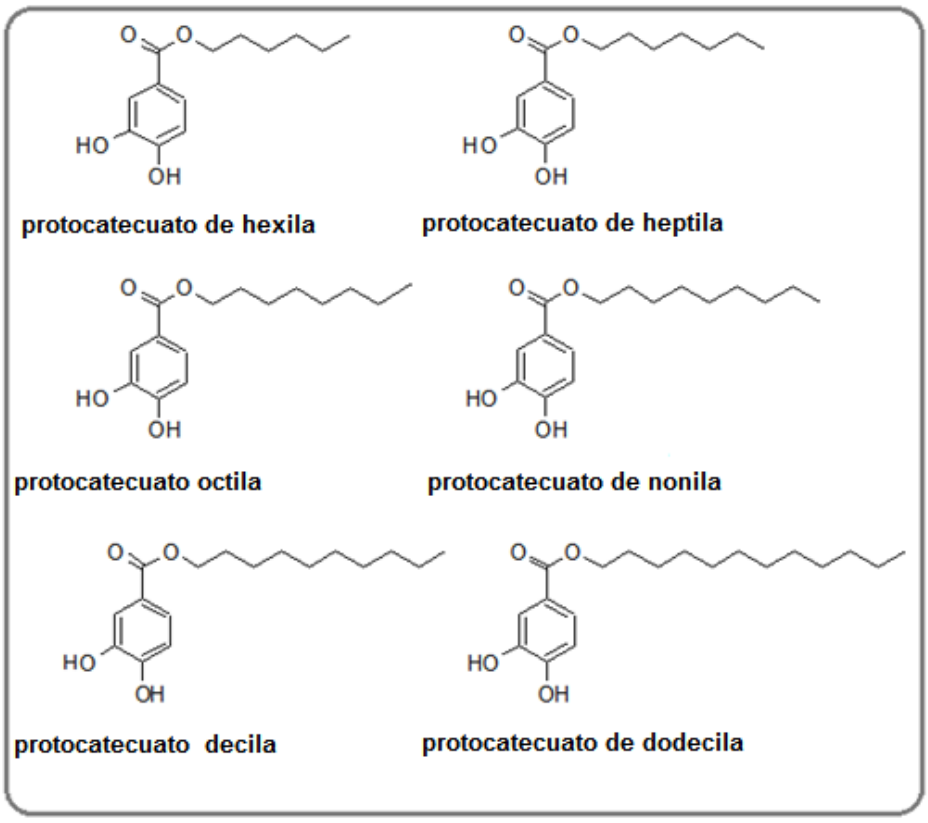


Figura 02. Estrutura química dos protocatecuatos.

A presença das substâncias fenólicas tem sido muito estudada por estes apresentarem atividades farmacológicas e também por inibirem a oxidação lipídica e a proliferação de fungos. Os ácidos fenólicos são caracterizam-se por terem um anel benzênico, umacarboxíla e um ou mais hidroxilas e/ou metoxilas na estrutura (SOARES, 2002).

Estudos de laboratório com animais demonstraram que o ácido protocatecuico é um eficaz anticarcinogênico com propriedades antioxidantes apresentando efeitos antifúngicos contra dermatófitos, alem disso protege contra o estresse oxidativo, exerce efeitos preventivos nas doenças cardiovasculares que estão associados aos radicais livres (REIS, 2010).

Encontramos aos protocatecuatos ou ácidos protocatecuicos em plantas como *Roselle* (*Hibiscus sabdariffa L*) é um aliemneto funcional utilizado na Ásia, como China, Japão, Coréia e Taiwan. *Roselle cálice* pode ser tratada como uma fruta preservada com açúcar ou usado como um ingrediente de uma bebida de chá-like (localmente chamado chá da flor), misturando com rosa e crisântemo o suco de *cálice Roselle* é uma popular bebida em Taiwan. O extrato aquoso desta planta pode inibir várias bactérias infecciosas hospitalares, tais *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina como e *Klebsiella pneumoniae* (LIU et al., 2008).

O Ácido protocatecuico é um polifenol contendo uma subestrutura de 3,4 -di-hidroxi, é um composto que ocorre naturalmente em *Roselle cálice*. Vários estudos in vitro estudos indicaram que este composto pode inibir o crescimento de *E. coli* e fungos (FERNANDEZ et al., 1996; AZIZ et al., 1998). A capacidade inibitória do presente agente contra *S. typhimurium DT104, L. monocytogenes, S. aureus e B. cereus* é limitada. O extrato etanólico *Rosell cálice* e o ácido protocatecuico podem ser agentes potentes para evitar a contaminação de alimentos por bactérias. (CHAO; YIN, 2009).

Doenças transmitidas por alimentos, que são provocadas por bactérias e fungos, são de grande preocupação no desenvolvimento, bem como países desenvolvidos (MEAD et al., 1999). Portanto, a química de conservantes tem sido amplamente utilizada na indústria de alimentos para impedir o crescimento de micróbios e desta forma estragar os alimentos (NATTA et al., 2008*).*

Veronica (Plantaginaceae) é um gênero de 450 espécies de plantas encontradas em regiões temperadas de ambos os hemisférios (MUNOZ et al., 2007). Numerosos estudos sobre a identificação de metabólitos secundários em espécies de *Veronica* já tem sido publicada, sendo glucósidos iridóides, feniletanóides e glicosídeos flavonoides relatados principalmente (TANAKA et al., 2010; HARPUT et al., 2011).

Além da importância quimiotaxonômico e fitoquímico, a espécie *Veronica* tornaram-se proeminente devido aos seus usos tradicionais e atividades biológicas são usados principalmente como diuréticos e para a sua cicatrização de feridas propriedades na medicina tradicional turca. No tratamento médico da gripe e outras doenças respiratórias (HARPUT et al., 2011).

O principal composto fenólico de *V. montana* que é um ácido protocatecuico que foi avaliado após a sua constituição em creme de queijo contaminado com *Listeria monocytogenes*. O modo de ação antimicrobiana, conservante. Sendo um produto natural presente em muitas espécies de plantas amplamente consumido, podemos presumir que o ácido protocatecuico é seguro para a suplementação usada na comida. (STOJKOVIĆ et al., 2013).

As substâncias em estudo chalconas e protocatecuatos foram sintetizadas através da colaboração com o Instituto de Química da UNESP de Araraquara sob a coordenação do NUBBE, modificadas estruturalmente e selecionadas por prospecção guiada pela atividade antifúngica.

Desta forma, deseja-se desenvolver um protótipo antifúngico a partir de substâncias semissintéticas derivadas de chalconas, e dos protocatecuatos e iniciar estratégias focadas em mecanismos de ação que envolva o início do estabelecimento da infecção por este fungo (processo adesivo).

Adicionalmente realizou-se a incorporação destas moléculas em sistemas nano estruturados para o desenvolvimento de carreadores que possam adicionar bioestabilidade, solubilidade e citotoxicidade dando segurança e eficácia ao protótipo.

Estratégias tecnológicas como sistemas lipídicos nanoestruturados, que têm a capacidade de compartimentalizar, de forma eficiente o fármaco sem modificar suas propriedades nem sua atividade biológica, são muito promissoras para a entrega de protótipos antifúngicos.

1.7. Nanotecnologia e sistemas de liberação

A nanotecnologia de sistemas de liberação prolongada de fármacos surgiu no início da década de 80, como um método comercialmente atrativo para administração de fármacos e obtenção de sua ação prolongada modulando a velocidade com que estes atravessam as barreiras biológicas, penetram à circulação e atingem o alvo farmacológico. (OLIVEIRA *et al*., 2004).

Os sistemas de nanoestruturados permitem que o protótipo antifúngico alcance o local de ação especificamente devido a solubilidade, biodisponibilidade, promove efetiva potencialização devido à liberação gradativa e constante, a estabilidade, bem como a proteção de toxicidade e atividade biológica. Existem estudos que revelam a capacidade antimicrobiana com atividade de amplo espectro contra vírus, fungos e bactérias de microemulsões e nanoemulsões altamente estáveis não incorporados. (PANNU et al., SUTCLIFFE et al., 2008).

Os novos sistemas de distribuição de drogas têm a capacidade não só para aumentar a eficácia dos componentes ativos, aumentando a seletividade e eficácia, protegendo contra foto -degradação térmica ou , reduzindo os efeitos colaterais , e controlar a liberação de constituintes ativos Estas tecnológicas revolucionaram a entrega da droga. (VENUGOPAL et al., 2009).

Dentre os vários sistemas nanoestruturados podemos mencionar as micro e nanoemulsões, liposomas entre outros.

1.7.1. Nanoemulsões

As nanoemulsões são emulsões com tamanho de gota em escala nanométrica (tipicamente de 20-200nm) são muitas vezes referidas em a literatura como miniemulsions (EL-AASSER et al., 2004) nano- emulsões, emulsões submícron, etc O termo nano- emulsão (SONNEVILLE-AUBRUN O. et al., 2004) é o preferido porque, além de dar uma idéia da faixa de tamanho em nanoescala das gotas, é conciso e evita erros de interpretação com o termo microemulsão (que são sistema termodinamicamente estáveis).

Apesar da instabilidade termodinâmica, as nanoemulsões são sistemas cineticamente estáveis e apresentam diversas potencialidades como sistemas carreadores de fármacos, especialmente para aqueles de reduzida hidrossolubilidade. Estudos recentes descrevem a possibilidade de redução de toxicidade, aumento de atividade, janela terapêutica e biodisponibilidade e, em alguns casos, uma liberação controlada e direcionada de fármacos incorporados nesses sistemas. (WANG et al., 2008)

Devido ao seu tamanho característico, nano- emulsões são translúcido para o olho nu e possui estabilidade contra a sedimentação ou formação de creme. Estas propriedades fazem nano- emulsões de interesse para fundamentais estudos e para aplicações práticas (por exemplo, químico, farmacêutico, cosméticos, etc. campos) (SOLANS et al., 2002), figura 03.

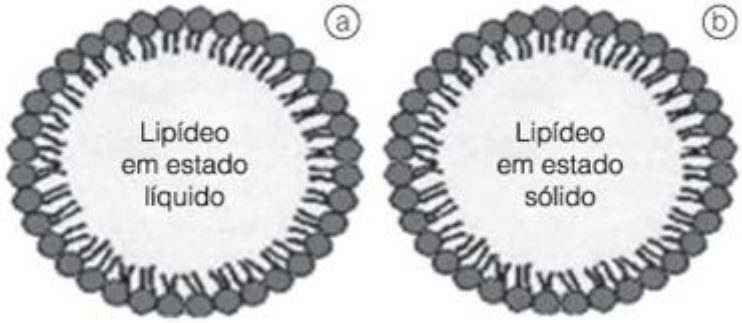


Figura 03. Esquema representativo de uma nanoemulsão (a) e um uma nanoparticula lipídica solida (B) (MULLER et al., 2000).

1.7.2. Microemulsões

As microemulsões (ME) é definida como um sistema termodinamicamente estável e isotropicamente traslúcido de dois líquidos imiscíveis, usualmente água e óleo, estabilizados por um filme interfacial de tensoativos localizados na interface óleo/água (ABOOFAZELI et al., 1993; CONSTANTINIDES et al., 1995). A formulação de MEs geralmente envolve a combinação de três a cinco componentes: óleo, água, tensoativo, cotensoativo e eletrólito (ABOOFAZELI et al., 1993; CONSTANTINIDES et al., 1995; ROSANO, 1974; DAMASCENO et al., 2011).

É possível se estabelecer nitidamente diferenças entre uma ME e uma emulsão. As principais diferenças. A tensão interfacial de uma ME é muito baixa quando comparada com a tensão interfacial de uma emulsão. Isso pode levar a formação espontânea das MEs e, consequentemente, a um pequeno tamanho das gotículas. Enquanto isso, as emulsões são dispersões opticamente turvas e leitosas e, normalmente, só podem ser obtidas por agitação mecânica devido a sua instabilidade termodinâmica (BAGWE et al., 2001; TENJARLA, 1999). As gotículas possuem um diâmetro de 1000-20000nm, são termodinamicamente estáveis, altamente dinâmicos, com um área interfacial bastante grande, são necessários de grande quantidade de tensoativo é necessária para estabilização, figura 04.

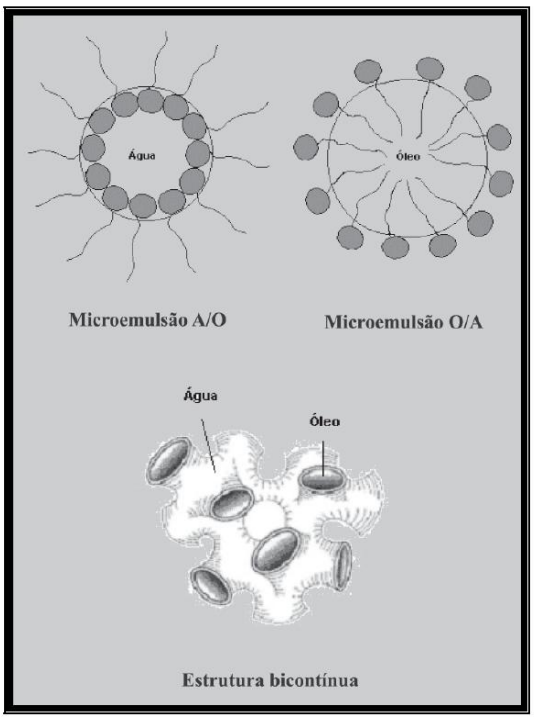


Figura 04. Esquema representativo de uma microemulsão (FORMARIZ et al., 2008).

1.7.3. Lipossomas

Um lipossoma é uma vesícula esférica com uma membrana composta de uma camada dupla de fosfolípidos, os quais consistem de partes solúveis em gordura e solúveis em água .

Os fosfolípidos naturais são obtidas a partir de soja, e em solução aquosa são a estrutura esférica chamada lipossoma. Durante este processo de agregacao, as caudas lipofilicas do contacto fosfolípido entre eles de modo a formar uma membrana de bicamada que é hidrófilo nas suas partes exteriores e interior lipófila, figura 05, (HUGHES, 1975; MADRIGAL-CARBALLO et al., 2009).

A tecnologia dos lipossomas possui aproximadamente 21 anos. A estrutura dos lipossomos é constituída de duas camadas lipídicas, e em seu interior encontra-se o fármaco de escolha. A diferença de DLP para os outros antracíclicos lipossomais é a cobertura da camada externa do lipossoma com polietilenoglicol (PEG), que confere a esta estrutura características únicas (GABIZON, 1994; FORMARIZ et al., 2008).

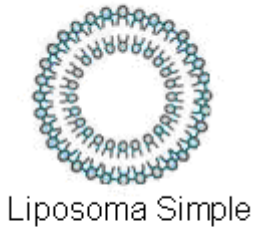


Figura 05. Esquema representativo de um liposoma simple (MADRIGAL-CARBALLO et al., 2009)

1.7.4. Principais componentes utilizados no preparo do sistema nsnoestruturado lipídico

Um dos maiores problemas associados ao desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos é a escolha dos constituintes. Essa escolha deve ser bastante criteriosa, e deve atender alguns requisitos, tais como, não irritabilidade, atoxicidade, capacidade de formar o sistema desejado (LAWRENCE, REES, 2000).

A) Agentes tensoativos

Os tensioativos, também chamados de surfactantes, são substâncias que diminuem a tensão superficial ou influenciam a superfície de contato entre dois líquidos. Estas moléculas podem ser encontradas como um monômero em solventes hidrofílicos alterando a concentração e a temperatura favorecendo assim a formação dos diferentes sistemas como cristais líquidos, Microemulsoes e nanoemulsoes associadas às interações entre as moléculas da micela, desta forma influenciam o tipo de sistema formado (GUSTAFSSON *et al*., 1997).

Entre os principais representantes dos grupos de tensoativos citados, destaca-se a utilização do óleo de rícino polioxil- 40 - hidrogenado (Eumulgin HRE® 40) (FORMARIZ et al., 2006), com baixa viscosidade, o que contribui com a praticidade do processo de preparação do sistema e não influencia significativamente nas propriedades reológicas do produto obtido (CUNHA-JÚNIOR et al., 2003). Assim os fosfolipídeos (principalmente, a fosfatidilcolina de soja apresentam baixa toxicidade e são substâncias utilizadas de maneira corriqueira na produção de microemulsões (VANDAMME, 2002).

B) Co-tensoativos

Os co-tensoativos são responsáveis pela redução adicional da tensão interfacial necessária para a formação e estabilidade termodinâmica do sistema, além de promoverem fluidificação do filme interfacial formado pelo tensoativo, impedindo na maioria das vezes a elevação da viscosidade do sistema obtido (CUNHA-JÚNIOR *et al*., 2003).

Assim, o co-tensoativo mais utilizados em preparações farmacêuticas injetáveis destinadas à nutrição parenteral e quimioterapia é o oleato de sódio (FORMARIZ *et al*., 2006; FAMAP, 2008). Esse tensoativo é classificado como um tensoativo do tipo aniônico possui EHL igual a 18, e é utilizado como agente solubilizante (LACHMAN *et al*., 2001).

C) Fase oleosa

Os principais parâmetros relacionados com a escolha da fase oleosa a ser empregada no preparo do sistema nanoestruturado lipídico estão relacionados, principalmente, à possibilidade de obtenção do próprio sistema e das características de solubilidade do fármaco a ser veiculado (CUNHA-JÚNIOR *et al*., 2003).

Os óleos de elevada cadeia carbônica não permitem a obtenção do sistema e aqueles de natureza menos apolar (triglicérides, principalmente) permitem a dissolução de maiores concentrações de farmacos lipossolúveis.

A literatura também mostra o efeito do colesterol (colest-5en- 3β-ol) como fase oleosa nas propriedades estruturais e termodinamicas de microemulsões lipídicas (STIDDER *et al*., 2005).

Dependendo da proporção colesterol/tensoativo fases liquido-cristalinas isotrópicas e anisotrópicas podem existir uma vez que esses agregados podem originar diferentes microestruturas, tais como fases cúbicas, hexagonais e lamelares, além de cristais de colesterol (BRINON et al., 1999; EZRAHI et al., 1999; FARKAS et al., 2001). Essas formas de agregação do colesterol podem influenciar diferentemente a velocidade de liberação dos fármacos antifúngicos neles incorporados (FORMARIZ *et al.*, 2007; 2008).

D) Fase aquosa

A literatura relata que na composição da fase aquosa pode ser necessária a adição de tampões e/ou agentes isotonizantes tendo como finalidade à obtenção e manutenção de um pH favorável garantindo assim, o efeito terapêutico e à estabilidade do fármaco (CUNHA-JÚNIOR *et al*., 2003). Dessa maneira, utilizou-se como fase aquosa o tampão fosfato 0,01M pH 7,4 uma vez que a microemulsão utilizada irá ser aplicada pela via parenteral

Assim, o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos para administração endovenosa tem sido um dos principais temas de pesquisa em tecnologia farmacêutica nos últimos anos. Entre as alternativas avaliadas, destacam-se principalmente as microemulsões e nanoemulsões (PRETE *et al*., 2006; FORMARIZ *et al*., 2006; DIAS *et al*., 2007).

A estratégia de incorporação de extratos vegetais em sistemas nanoestruturados tem sido bastante citada na literatura. Kesarwani e Gupta (2013) publicaram um artigo de revisão no qual mencionam uma série de trabalhos empregando sistemas nano estruturados para otimizar as propriedades de extratos vegetais.

Bhatacharya e Ghosh (2009) utilizaram sistemas baseados em lipídios para incorporação de extrato de chá verde e ginseng, com o objetivo de aumentar a absorção dos componentes do extrato. (SU et al., 2008) desenvolveram nanopartículas de *Radix salvia* e observaram melhora da biodisponibilidade do extrato. (SINICO et al., 2005) desenvolveram lipossomas de *Artemisia arborescens* e notaram que estes sistemas propiciaram aumento da penetração dos componentes desta planta na barreira citoplasmática viral. (RAJENDRAN et al., 2013) obtiveram nanopartículas de extrato metanólico de *Ocimum sanctum* e observaram melhor ação antimicrobiana para o extrato encapsulado do que na forma livre quando testado contra *Escherichia coli, Bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus, estudos mostraram atividade contra, dermatofitos e C. calbicans (*PANNU et al., 2008).

1.8. Teste de sensibilidade

Nos últimos anos, novos agentes antifúngicos tornaram-se disponíveis, resultando em uma mudança no padrão de cuidado para muitas destas infecções. No entanto, ainda existem algumas limitações dos atuais agentes antifúngicos, além do rápido surgimento de resistência medicamentosa e de que a letalidade causada por alguns fungos, como *P. brasiliensis*, por ser considerada progressiva, puseram em evidência a necessidade da utilização de novas estratégias terapêuticas e preventivas, além da descoberta de novos agentes antifúngicos, de preferência com novos mecanismos de ação (BABU, LI *et al.*, 2006; PERLROTH, CHOI *et al.*, 2007).

Por outro lado, para poder evidenciar a presença de cepas resistentes e a descoberta de novos fármacos são necessários testes padronizados (CUENCA-ESTRELLA; RODRIGUEZ-TUDELA, 2010).

Os testes de sensibilidade a antifúngicos passaram por um longo e complexo processo de padronização no final do século passado. O instituto norte americano *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI), até 2005, denominado NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*), contribuiu de modo significativo para a normatização de técnicas de referência. Métodos para avaliação da sensibilidade das principais leveduras e fungos filamentosos de interesse médico foram publicados e são continuamente aperfeiçoados (PFALLER, 2012).

Os métodos de referência vêm sendo recomendados para avaliação de atividade de anfotericina B, 5-fluorocitosina, cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, ravuconazol e equinocandinas o mesmo método se estende para as novas substancias naturais através da bioprospeccao. (MENDES-GIANNINI, MELHEM *et al.*, 2012).

Testes de sensibilidade com agentes antifúngicos, no entanto, são fortemente influenciados por uma variedade de fatores, incluindo o tamanho do inóculo, características físico-químicas do agente antifúngico testado, meio utilizado para a análise, temperatura e tempo de incubação. Além disso, uma das principais fontes de variação especialmente para azóis é o fenômeno parcial de inibição do desenvolvimento do fungo, ou *trailing*, que dificulta a determinação do ponto final de leitura da CIM (BARCHIESI et al., 1994).

O desenvolvimento de um agente antifúngico é um desafio porque os possíveis alvos podem ser compartilhados pelo fungo e a espécie humana, desde que ambos são eucariotos. O antifúngico ideal deve ter um amplo espectro de atividade, ter ação fungicida, estar disponível para administração oral e parenteral, causar poucas interações medicamentosas, ser seguro em doses eficazes, ter baixo custo-efetivo e ser estável à resistência microbiana.

Recentemente nosso grupo desenvolveu a adaptação do método preconizado CLSI M27A3 para leveduras de *Paracoccidioides sp* para a determinação da sensibilidade de isolados frentes aos fármacos anfotericina B e itraconazol (DE PAULA E SILVA et al., 2013).

Adicionalmente moléculas antifúngicas foram testadas as chalconas e os protocatecuatos e estas incorporadas no sistema nanoestruturado com a metodologia já descrita, posteriormente o melhor protótipo foi caracterizado quanto ao mecanismo de ação

pela abordagem proteômica diferencial evidenciando novos alvos para o *Paracoccidioides brasiliensis*.

1.9. Análise Proteômica

A análise sistemática das proteínas totais de um tecido ou célula foi popularizada sob o termo proteômica (DOMON; AEBERSOLD, 2006). Este termo foi introduzido no início dos anos 90 por Wilkins para indicar a proteína total e complementar expressa pelo genoma de uma célula, tecido ou organismo (WILKINS, PASQUALI *et al.*, 1996; WILKINS, SANCHEZ *et al.*, 1996). Uma análise proteômica tem o objetivo de obter a mais completa e integrada visão da biologia através do estudo de todas as proteínas da célula, em preferência a estudar proteínas individuais (GRAVES, HAYSTEAD, 2002).

As metodologias em análise proteômica continuam se desenvolvendo a uma grande velocidade e a utilização destas abordagens, da mais simples as mais complexas levaram a inúmeros êxitos nos estudos dos sistemas biológicos o que tem incentivado pesquisadores a elaborar suas propostas de pesquisa empregando estas técnicas para melhorar a qualidade e aumentar a quantidade de respostas biológicas (MANN, 2006).

Uma análise proteômica exige a separação de proteínas com alta resolução para posterior análise. A separação das proteínas de uma mistura complexa em géis de poliacrilamida por eletroforese bidimensional, seguida da identificação em espectrômetro de massas é o método mais amplamente utilizado (WASHBURN, WOLTERS *et al.*, 2001).

Um experimento proteômico típico pode ser dividido em partes conforme: a separação, o isolamento e a quantificação das proteínas, a aquisição de informação estrutural da proteína com propósito de identificar e caracterizar, o sequenciamento das proteínas por espectrometria de massa e a utilização de bancos de dados (GRAVES; HAYSTEAD, 2002).

As proteínas são os principais alvos da descoberta de fármacos. Por meio de técnicas proteômicas é possível identificar a mudança de expressão de um determinado sistema em estado patológico ou quando exposto a uma substância, sendo útil para estudar os alvos e os mecanismos de ação das substâncias (WALGREN, THOMPSON, 2004).

Assim as investigações proteômicas podem incluir a identificação de biomarcadores na pesquisa clínica, análise da interação entre as proteínas, modificações pós-traducionais, além da identificação de alvos no estudo de mecanismos de novos fármacos (WESTERMEIER, 2005), como os estudos relatados na literatura em que se utilizaram das

ferramentas da técnica de proteômica para avaliar as propriedades antioxidantes do extrato de Alperujo (RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ, DUTHIE et al., 2012).

Em nosso laboratório foi utilizada a análise proteômica para a investigação da ação de substâncias de origem natural com atividade antifúngica, para o qual extratos brutos AcOEt e EtOH derivados de *Kielmeyera rubriflora*, além de fluconazol, contra a levedura *Candida albicans* e *C. krusei* foram submetidos a análise proteica por eletroforese bidimensional. Nas duas leveduras foram observadas várias alterações na expressão de proteínas. Em *C. albicans* tratada com fluconazol foram observadas nove alterações na expressão de proteínas e em *C. krusei* 11 modificações, já com ambos os extratos verificou-se aumento ou diminuição de 66 proteínas. Por outro lado, 44 proteínas não foram expressas após o tratamento. Aparentemente, ambos os extratos foram mais eficientes para inibição da expressão protéica de *C. krusei*, sugerindo a existência de alvos específicos (CECCHETTI et al., 2012).

Em outro trabalho envolvendo a técnica da proteômica no estudo da atividade antifúngica de substâncias avaliaram o crescimento de *P. brasiliensis* na presença de oenotoína B, isolado de *Eugenia uniflora.* À 500µg/mL essa substância foi eficaz com inibição de 74 % *in vitro.* As células fúngicas foram observadas por microscopia eletrônica, e alterações celulares caracterizaram inibição da síntese de glucana, incluindo esmagamento, superfície áspera, ruptura da parede celular e membrana celular. Por meio da análise gênica, foi observado que esta substância inibiu a transcrição do gene 1,2,3,-beta-glucanosintase, o qual este envolvido na síntese de parede celular (SANTOS, FERRI et al., 2007).

Os fungos e os seres humanos possuem algumas vias metabólicas homólogas, o que consequentemente dificulta o desenvolvimento de antifúngicos. A partir desse ponto, se destaca a importância no estudo e identificação de novos e seletivos alvos moleculares para o desenvolvimento de novos antifúngicos com o objetivo de minimizar a toxicidade relacionada a essa homologia e de expandir talvez o espectro de ação antifúngica. Atualmente a biotecnologia auxilia essa pesquisa fornecendo inúmeras ferramentas de analise fenotípica e genotípica, contribuindo para estudos direcionados, como o proposto nesse estudo, no qual substancias com potencial atividade antifúngica propiciaram um vasto estudo dos alvos moleculares afetados no fungo patogênico *Paracoccidioides* spp.

Em nosso estudo a análise proteômica foi direcionada para a prospecção de alvos proteicos atingidos após o contato do protótipo antifúngico a partir das proteínas

diferencialmente expressas. Além disso, uma seleção de proteínas foi realizada com base na massa molecular e ponto isoelétrico de adesinas de *Paraciccidioides* sp.

2.OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Investigar os efeitos anti-*Paracoccidioides brasiliensis* dos derivados sintéticos de chalconas e protocatecuatos obtidos de fontes vegetais e incorporadas no sistema nanoestruturado, que possam interferir na adesão do fungo durante o processo de infecção, além de identificar novos alvos potenciais para o desenvolvimento de protótipos antifúngicos por meio de abordagem proteômica diferencial.

2.2. Objetivos Específicos

a) Verificar a atividade antifúngica dos derivados de chalconas, dos protocatecuatos obtido, através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

b) Verificar citotoxicidade *in vitro* de chalconas, protocatecuatos utilizando as técnicas de MTT e Sulforodamida B.

c) Verificar a atividade antifúngica e a citotoxicidade das chalconas e protocatecuatos incorporados no sistema nanoestruturado através dos ensaios mencionados anteriormente.

d) Verificar atividade anti-adesão dos protótipos antifúngicos chalconas e protocatecuados selecionados e dos mesmos incorporados no sistema nanoestruturado sobre os isolado do *Paracoccidioides brasiliensis* nas superfície da matriz extra celular (MEC).

d) Determinar o perfil proteômico e diferencial do fungo após contato com substância antifúngica eleita e esta incorporada ou não no sistema nanoestruturado.

e) Identificação das proteínas selecionadas, expressas diferencialmente antes e após contato com o substância selecionada e com a mesma incorporada no sistema nanoestruturado.

3. METODOLOGIA

3.1. Preparo das substâncias

As substâncias foram obtidas por meio do projeto Biota-FAPESP, Bioprospecta-FAPESP e Sisbiota CNPq, coordenados pela Profa. Dra. Vanderlan da Silva Bolzani e Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva, produzido pelo Prof. Dr. Luís Octavio Regasini e pelos doutorandos Maicon Segalla Petrônio e Luiz Dutra, no Instituto de Química da UNESP–Araraquara. Estas foram diluídas assepticamente em concentrações e quantidades adequadas de dimetilsulfóxido e solubilizados com o auxílio do vórtex. Foram realizados cálculos para que a faixa de concentração da substância para a avaliação da atividade antifúngica fosse iniciada com 250 µg/mL.

3.2. Microrganismos e condições de cultivo

Foram empregados isolados de *Paracoccidioides* da espécie filogenética *Paracoccidioides brasiliensis* S1, isolado 18 (isolado clínico humano de pulmão PCM fase crônica de São Paulo), na fase leveduriforme, procedente da micoteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP) e *P. lutzii*, Pb01-like – cepa ATCC MYA-826 (Pl01-isolado clínico humano PCM fase aguda–pulmão/Goiânia) (procedente da Universidade Federal de Goiânia), ambas advindas de casos de paracoccidioidomicose. Posteriormente, o teste de microdiluição foi desenvolvido com as espécies filogenéticas *Paracoccidioides brasiliensis* S1, S2 (isolado 02–PCM crônica/Venezuela). Durante a realização deste trabalho, todos os isolados utilizados foram mantidos em meio de Fava-Netto (Fava Netto, 1961) em estufa a 37 ºC e repicados a cada 3 ou 4 dias. Após 10 repiques, o isolado foi passado em monocamada de células A549 e reisolado em meio de Fava-Netto, para a recuperação da virulência.

3.3. Preparação do Inóculo

Inicialmente, *P. brasiliensis* espécies filogenéticas S1 e S2, (isolados Pb18 e Pb02 respectivamente) e *P. lutzii* foram cultivados de 4 a 6 dias, a 37 °C, em meio de ágar Fava-Netto. Num tubo falcom com um volume de 3-4 mL de tampão fosfato pH 7,2 (PBS) estéril foram adicionados as colônias do fungo que foram desprendidas do meio com auxílio de uma alça descartável, tomando o cuidado para que não houvesse o desprendimento do meio de cultura. Esta suspensão foi deixada decantar por 5 minutos para que as células maiores e/ou

aglomerados celulares depositassem no fundo. O sobrenadante foi transferido para outro tubo estéril e verificada a concentração de células por meio de leitura em hemocitômetro. A leitura da concentração das células presentes na suspensão foi realizada hemocitômetro com base na contagem dos 16 de quadrantes. A concentração de células desejável deve foi estabelecida entre 10^6-10^7 UFC/mL (NAKAI et al., 2003).

3.4. Teste de Sensibilidade

O teste de sensibilidade foi realizado de acordo com o documento M27-A2 padronizado pelo CLSI 2002 com modificações (DE PAULA E SILVA, et al., 2013). Para a obtenção da CIM frente aos fármacos anfotericina B e itraconazol foram utilizados os isolados do Complexo *Paracoccidioides spp* espécies filogenéticas S1 e S2, (isolados Pb18 Pb02 respectivamente) e *P. lutzii*, Pb01-like. Os antifúngicos padrões foram preparados de acrodo com o documento M27-A2. No meio RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*), com L-glutamina sem bicarbonato de sódio, tamponado com MOPS 0,165M, pH 7,0, e adicionalmente foi suplementado com 2 % de glicose (RPMI-1640 2 %) de acordo com (TAKAHAGI et al., 2009). Da mesma forma se avaliou o efeito do solvente (DMSO) que se utilizou para dissolver as substâncias (chalconas e protocatecuatos), foi realizado um controle em que se colocou 200 µL do solvente no primeiro poço, nos poços subsequentes foram colocados 100 µL de (RPMI-1640 2 %). Em seguida, foram repassados 100 µL do poço de 200 µL através de uma diluição seriada, obtendo-se uma diluição do DMSO de 50 % a 0,098 %. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.5. Avaliação da atividade antifúngica

Nos testes de sensibilidade por microdiluição, utilizou-se espécies filogenéticas do Complexo *Paracoccidioides spp,* espécies filogenéticas S1 e S2, (isolados Pb18 Pb02, respectivamente) e *P. lutzii* (isolado 01, Pb 01). Os ensaios foram realizados de acordo com o documento M27-A2 (2002) do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) com adaptações para leveduras de *Paracoccidioides* sp (DE PAULA E SILVA, et al., 2013). O meio de cultura utilizado para a realização dos testes de sensibilidade foi o RPMI-1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio e acrescido de 2% de glicose, tamponado com MOPS 0,165 M, pH 7,0. O controle do crescimento (controle positivo) foi realizado com 100 µL de meio (RPMI-1640 2%) e 100 µL do inóculo, e o controle negativo do teste apenas com 200 µL do meio (RPMI-1640 2 %). Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços, foram

utilizados 100 µL resultante da diluição seriada do primeiro poço que contém 200 µL do meio (RPMI-1640 2 %) mais o farmáco antifúngico testado, resultando em 100 µL por poço. Posteriormente se adicionou 100 µL do inóculo, a partir da suspensão de 10^6-10^7 UFC/mL, foi feita uma diluição 1:50 em PBS estéril, fazendo o ajuste para a porcentagem de células vivas encontradas. A partir desta, foi feita uma diluição 1:20 em (RPMI-1640 2%) do volume total, que seria utilizado no experimento. O inóculo e as concentrações dos antifúngicos foram diluídos a 1:1, chegando-se à concentração final desejada de inoculo de $5x10^2$-$2{,}5x10^3$ UFC/mL. Como controles foram utilizados os fármacos anfotericina B e itraconazol. As placas foram incubadas a 37 °C por um período total de 72 a 96 horas (TAKAHAGI et al., 2009), com agitação a 150 rpm.

Para a leitura das placas foi empregado o reagente *Alamar blue*®. Esta reagente é aplicada nas placas no período de incubação. Assim, depois de 48 horas de incubação foi adicionado 20 µL/poço do reagente 10X (Invitrogen), o qual não interfere na viabilidade da célula fúngica. Assim, a placa foi incubada por mais 24 ou 48 horas, completando 72 a 96 horas já referidas. As leituras das placas foram feitas da maior para a menor concentração, determinando-se a menor concentração do agente antifúngico que inibe substancialmente o crescimento do organismo visualmente detectado quando não houvesse mudança na cor azul original do reagente, sendo sempre comparado com o do controle de crescimento, denominado então CIM (concentração inibitória mínima). Confirmando a leitura visual, foram realizadas leituras por espectrofotômetro a 490nm. Os testes foram realizados em triplicata.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi considerada a menor em que se observou inibição do crescimento fúngico (de 50 a 80% de inibição) de acordo com o documento M27A2S3 (2008). Os extratos que apresentarem uma CIM menor que 75µg/mL é considerada uma atividade antifúngica forte, entre 75 a 150 µg/mL, possuem atividade antifúngica moderada, entre 150 a 250 µg/mL e fraca é maior que 250 µg/mL inativo (SCORZONI *et al*, 2007).

3.6. Análise da inibição do crescimento do fungo (InCell Analyzer 2000)

A placa de microtitulação foi preparada de acordo com o teste de sensibilidade como descrito acima. Depois de 72 a 96 horas de incubação, a placa foi analisada no equipamento In Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare) com um aumento de 20 vezes para a observação preliminar das da inibição dos isolados após contato com os protótipos antifúngicos.

3.7.. Cultura de células

Nos ensaios celulares em cultivo foram utilizadas as linhagens celulares normais NOK (células orais normais imortalizadas com o gene h-tert doadas pelo Dr Karl Munger do Department of Medicine Harvard Medical SchooL), HaCaT (células de queratinócitos normais), células MRC-5 (fibroblastos de pulmão humano) e linhagens tumorais A549 (células tumorais de pulmão humano) obtidas do banco de células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em garrafas com o meio específico para cada linhagem, acrescido de 10% de soro fetal bovino (SBF) e 2 % de antibiótico ATB (complexo estreptomicina, penicilina, gentamicina e anfotericina B), quando permitido. As células foram mantidas à temperatura de 36,5 ºC com 5 % de CO_2, o meio foi retirado e as células foram lavadas com 5 mL de PBS e tripsinizadas. Em seguida foi adicionado o meio de cultivo com 10 % SFB para neutralização da tripsina evitando danos às células. Com essa suspensão celular, foram preparadas placas para os ensaios de citotoxicidade das substâncias antifúngicas.

3.8. Avaliação da citotoxicidade

Foram utilizados linhagens MRC5, A549, NOK e HaCaT as quais foram preparadas em placas de 96 poços com as células, contendo 2,5 x 10^3 a 5 x 10^4 células por poço. As placas foram incubadas a 36,5 ºC com 5% de CO_2, por 24 ou 48 horas para a formação da monocamada celular (Husoy *et al.*,1993). A viabilidade celular foi estudada nas concentrações próximas da CIM, assim como a concentração onde apresentam 80% de células vivas. A citotoxicidade foi avaliada através do ensaio da sulforodamida B (SRB) a 0,1%, O ensaio é sensível e mede o conteúdo de proteína celular de culturas aderentes ou em suspensão em placas de 96 poços. As células foram fixadas com ácido tricloro acético (TCA) e então coradas por 30 min. com SRB dissolvida em ácido acético. Em condições levemente ácidas, SRB se liga em resíduos de aminoácidos básicos em células fixadas com TCA. O corante não ligado é então éremovido após a lavagem e o corante ligado à proteína é solubilizado em meio básico (Tris-base). A absorbância foi mensurada pelo leitor de microplaca em 570 nm. Como controle positivo foi usado peróxido de hidrogênio. O resultado da percentagem de células viáveis, foi realizado através da seguinte equação:

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

As análises de citotoxicidade foram realizadas em triplicata com três experimentos independentes. Também foi utilizado um controle negativo com células não tratadas, sendo esta leitura considerada um total de 100% de células vivas.

3.9. Preparação do sistema nanoestruturado

Para o desenvolvimento do sistema, foram utilizadas metodologias baseadas nos trabalhos de Formariz et al. (2007, 2008, 2010), com adaptações. Para um frasco transparente com tampa foram transferidas quantidades adequadas de tensoativo não iônico óleo de rícino polioxil-40-hidrogenado (ORPH), fosfatidilcolina de soja (FS) e oleato de sódio (OS), nas proporções 8:6:3 respectivamente, num total de 10% de formulação para a fase oleosa, 10% do tensoativo e, em seguida, titulou-se com 80% de tampão fosfato 0,01M, pH 7,4 (fase aquosa), sob agitação em vortex alternada com repouso.

A mistura foi sonicada usando Sonicador, Sonics®, Vibra-Cell, com potência de 220 Watts, operando em modo descontínuo, por 30 minutos à temperatura ambiente nos seguintes parâmetros: Amplitude 21~22%; sendo 15 minutos para mistura e mais 15 minutos para incorporação; pulso 59 segundos, repouso 30 segundos. As formulações foram preparadas em triplicata.

Em seguida, incorporaram-se, separadamente, 1mg/mL de 2-hidroxichalcona (2-chalc) de 2'- hidroxichalcona, protocatecuato decila e protocatecuato de dodecila. As formulações foram esterilizadas através de filtração em capela de fluxo laminar (Veco®, Classe IIB) contínuo com membrana de acetato de celulose 0,22μm (Millipore). Todos os materiais utilizados para preparação da microemulsão foram autoclavados em autoclave vertical (Phoenix) a 121 °C, por 15 minutos.

3.10. Caracterização físico química

3.10.1. Determinação do diâmetro e do índice de polidispersão

O diâmetro médio e o índice de polidispersão do sistema nanoestruturado e das substâncias incorporadas na mesma foram determinadas através da técnica de espalhamento dinâmico de luz com um comprimento de onda de 633 nm a 25C e com angulo de 90. Todas as amostras foram diluídas com água purificada, as amostras foram medidas em triplicata com 10 determinações por cada amostra. As amostras foram analisados pelo Analisador de partículas ZetaSizer Nano-ZS, Malvern instrumentos acoplado a um titulador multiuso.(CSABA KOPING, HOGGARD; ALONSO 2010).

3.10.2. Caracterização do potencial zeta das nanopartículas

O potencial zeta das nanoparticulas foi determinado através da motilidade eletroforética das amostras. As análises foram realizadas pelo analizador de partículas ZetaSizer Nano-ZS, Malvern instrumentos acoplado a um titulador multiuso.

A medição efetuada por este equipamento é baseada no efeito *Doppler* que consiste na alteração da freqüência sofrida pela luz dispersa de uma partícula em movimento. A contagem dos fótons permite a elaboração de um espectro de freqüência a partir do qual o potencial zeta da particula pode ser calculado.

Para a realização das medidas do potencial zeta, as amostras foram diluídas em água purificada, analisadas em triplicata e foram realizadas 10 determinações do potencial zeta por cada amostra, calculando-se os valores médios e seus respectivos desvios padrões .(CSABA KOPING, HOGGARD; ALONSO 2010).

3.10.3. Determinação da morfologia do Sistema Nanoestruturado Lipídico e das substâncias incorporadas através da microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo

As amostras foram preparadas em água purificada previamente diluída com uma diluição de 1:10 e foram colocados sobre um substrato adequado para a leitura da fotomicrografia as amostras usadas foram SN (noemulsao), SN+2-chalc, SN+anfotericina B; SN+dodecil, SN+2'-chalc e SN+decila, foram medidas utilizando o Microscópio Eletrônico de Varredura de Efeito de Campo (MEV-FEG), modelo JEOL JSM-7500F. Foi usado aumento de 40X a 170000. Esta metodologia foi desenvolvida para visualizar a partícula e estimar o tamanho da partícula.

3.11. Adesão de *P. brasiliensis* (Pb18) às matrizes extracelulares artificiais

Primeiramente as placas de 24 poços (Corning ®) foram adsorvidas com cada matriz extracelular (MEC) separadamente, fibronectina e laminina (SIGMA) com concentração de 50 ug/mL por 18 horas a 4°C e 1 hora a temperatura ambiente. Após o período de adsorção as placas foram então lavadas 3 vezes com solução fisiológica tamponada com fosfato (PBS) 0,05 M, pH 7,2. O fungo foi removido do meio Fava-Netto e então foi realizada a suspensão em PBS e essa foi ajustada em 10^3 UFC/mL através de leitura em espectrofotômetro (DO=0,5 a 550nm). A seguir, 500 μL desta suspensão foi inoculada na placa já sensibilizada com os componentes da MEC. Estas infecções foram incubadas a 37º C por 2 horas. Após este tempo,

o sobrenadante foi retirado e a placa foi lavada três vezes com PBS e posteriormente cada poço foram adicionadas 300 μL de tripsina para retirar o fungo aderido à placa. As suspensões de tripsina foram então recolhidas em tubos tipo *eppendorfs* e centrifugadas a 2500 RPM à 4ºC. O sobrenadante foi então descartado e a cada tubo foi adicionado 500 μL de FACS Flow para posterior contagem de células através de citometria de fluxo em citômetro (BD FACSCanto), com o auxílio do software BDFACS Diva. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

3.12. Ensaio de inibição da adesão de *P. brasiliensis* às matrizes extracelulares artificiais

Após a construção e padronização da curva de adesão se estabeleceu o melhor tempo de adesão nas matrizes extracelular (MEC) separadamente (fibronectina e laminina), marca SIGMA, descritas anteriormente. Realizou-se o tratamento com as substancias eleitas (2-chalc e protecatecuato de dodecila) e com as mesmas incorporadas no sistema nanoestruturado por 24hr a 37 ºC, o meio usado foi RPMI-1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio e acrescido de 2% de glicose para manter as condições adequadas de nutrientes na adesão. Após este tempo, o sobrenadante foi retirado e a placa foi lavada três vezes com PBS e depois a cada poço foram adicionadas 300 μL de tripsina para retirar o fungo aderido à placa. As suspensões de tripsina foram então recolhidas em tubos *eppendorfs* e centrifugadas a 2500 RPM à 4ºC. O sobrenadante foi então descartado e a cada tubo *eppendorf* foi adicionado 500 μL de FACS Flow (diluente) para posterior contagem de células através de citometria de fluxo (BD FACSCanto), com o auxílio do software BDFACS Diva. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

3.13. Análise do perfil proteômico

3.13.1 Cultivo e tratamento do microrganismo

Foi cultivado o isolado de *P. brasiliensis* 18(S1), em ágar Fava Netto por quatro dia e transferido para caldo BHI por mais quatro dias a 37°C. As placas foram submetida à agitação em incubadora com agitação orbital (150 rpm), para crescimento da massa fúngica. Após o período de incubação de quatro dias o conteúdo do erlenmeyer foi transferido para tubo de fundo cônico de 50 mL e este foi centrifugado a 4°C por 10 minutos. Posteriormente se retirou o sobrenadante cuidadosamente e os sedimentos foram unidos. Lavou-se novamente com PBS e centrifugou-se por duas vezes para retirar o resto de sobrenadante, após a retirada

do mesmo se dividiu os sedimentos os quais foram pesados para obtenção de 1,5g contidos em tubos tipo falcons contendo $5x10^6$ UFC/mL.

Após esse período foi realizado o tratamento com as substâncias escolhidas em caldo RPMI-1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio e acrescido de 2% de glicose, por 24hr a 37°C submetida a agitação em incubadora orbital (150 rpm). (REZENDE et al., 2011), com modificações.

3.13.2. Extração total de proteínas

As amostras contidas em tubos de fundo cônico foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos a 4ºC. O sobrenadante foi descartado e foram feitas três lavagens com Tris HCl 10 mM. No final das lavagens o sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuspenso em 10 mL de Tris HCl 40mM pH8.8, com 4µL/mL de uma mistura de pepstatina, leupeptina, aprotinina, antipaina, quimiostatina - inibidor de proteases (PLAC - inibidor de protease - *SIGMA-ALDRICH*) e 40µL/mL de fenil metil sufonil fluoreto (PMSF - inibidor de protease - *SIGMA-ALDRICH*). A essa suspensão foram adicionadas pérolas de vidro estéreis. Em seguida, as amostras foram submetidas a processos de congelamento em nitrogênio líquido e agitação em vortéx, repetidos três vezes alternadamente. Para otimizar a extração, as amostras foram mantidas em sonicador por 15 minutos. Posteriormente, o conteúdo dos tubos de fundo cônico foi transferido para microtubos de 1,5 mL, que foram centrifugados a 4000 rpm por 45 minutos a 4ºC, para retirada de todos os restos celulares que sedimentaram após a centrifugação. A partir da suspensão final obtida, 50µL foi colocado em microtubo de 2mL para a dosagem de proteínas e 64µL foi transferido para outro microtubo de 1,5mL para realizar o gel de SDS-Page de acordo a Rezende et al., (2011), com modificações.

3.13.3. Determinação da concentração de proteínas totais: Método de Bradford

A dosagem das proteínas após extração foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Ao microtubo de 2mL com 50µL de amostra foi adicionado 1,5mL do reagente *Coomassie plus ™ protein assay*. Essa suspensão foi homogeneizada por inversão e deixada em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente. Após o tempo de reação, foi determinada a absorbância das amostras em 595 nm, usando espectrofotômetro (modelo *Genesys 10UV*). As concentrações das proteínas foram determinadas através da comparação com uma curva-padrão previamente estabelecida. Para análise do proteoma, foram feitos os cálculos para obtenção de 600 µg de proteína por mL.

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

Os perfis proteicos foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio, SDS-PAGE, sob condições redutoras, utilizando sistema de tampão descontínuo (LAEMMLI, 1970; STUDIER, 1973). Os componentes foram primeiramente separados em gel a 10% e em gel de empilhamento a 5% de acrilamida. Para a preparação desse gel foi usado solução estoque com 30% acrilamida e 0,8% bis-acrilamida. Para o gel de separação a polimerização foi feita em solução com 1,5M de Tris- HCl, pH 8,8 e 0,4% de SDS, em presença de 0,1%v/v de N, N,N', N'- tetrametiletilenodiamida (TEMED) e 0,1% de persulfato de amônio. O gel de empilhamento foi polimerizado em presença de 0,5M de Tris-HCl pH 6,8 e 0,4% de SDS, além de 0,1% de persulfato de amônio e 0,05% v/v de TEMED. Para o preparo da amostra foi utilizado 64µL da amostra diluída em tampão de amostra (1:4), que é composto de 62,5mM de Tris-HCl [tris (hidroxi-metil) aminometano] pH 6,8, 2% de SDS, 10% de glicerol, 0,5M de ditiotreitol e 0,002% de bromofenol. As proteínas foram dissociadas em banho maria por 3 minutos. A corrida eletroforética foi realizada com tampão composto por Tris 0,075M, glicina 0,57M e SDS 0,1%, pH 8,3, e a voltagem utilizada foi 10mA (50V) até a penetração no gel de separação, e a seguir a 20mA (120V) até o final do gel. A revelação do gel foi feita utilizando Azul de Coomassie G-250, para visualização do perfil específico de bandas.

3.13.5. Precipitação da amostra

Após a determinação da concentração protéica na amostra, um volume equivalente a 600 µg de proteínas foi pipetado e colocado em um microtubo de 1,5mL, a essa alíquota foi acrescido TCA 15% v/v e deixado a 4ºC por 45 minutos ou "overnight". Em seguida, essa suspensão foi centrifugada a 14000 rpm a 4ºC por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado três vezes com acetona 90%, com centrifugações a 14000rpm, 4ºC por 15 minutos a cada lavagem. Ao final das lavagens, o sobrenadante foi descartado e aguardou-se até a secagem dos pellets. O sedimento foi ressuspenso em 150 µL de solução de reidratação.

3.13.6. Reidratação da fita

A solução para reidratação da fita foi preparada com 250 µL de solução de reidratação, 1,25µL de IpG buffer com pH específico para a fita utilizada e 3 µL de DeStreak. Em seguida, a película plástica que protege o gel da fita foi retirada do lado positivo para o negativo, e colocada com a face do gel virada para baixo no Immobiline DryStrip Reswelling Tray *(GE Healthcare)*, imersa na solução de reidratação. A fita foi coberta com Cover Fluid, mais ou menos 5mL por canaleta, de forma a evitar a formação de bolhas.

3.13.7 Focalização Isoelétrica (IEF) – 1ª Dimensão

Os componentes protéicos foram primeiramente submetidos à focalização isoelétrica, utilizando o sistema Ettan IPGphor 3 *(GE Healthcare)*, para separação de acordo com o ponto isoelétrico (pI). O Manifold foi colocado no IPGhor III e às suas canaletas foi adicionado Cover Fluid. A fita foi colocada então com a face do gel voltada para cima nas marcações referentes ao tamanho da fita utilizada. A aplicação da amostra foi feita utilizando *Cup Loading*. Os pads foram colocados nas extremidades, os eletrodos foram posicionados em seguida. As fitas (*IPG-immobilized pH gradient*) selecionadas para a caracterização das proteínas presentes na amostra foram de 13 cm, lineares, com gradiente de pH de 4-7. No término da focalização, as fitas foram colocadas em tubos de vidro estéril e armazenadas a -80ºC até o equilíbrio e a segunda dimensão

3.13.8. Equilíbrio das fitas

Para o equilíbrio, inicialmente, foram adicionados 100 mg de DTT (agente redutor; *GE Healthcare*) a 10mL de solução de equilíbrio, que contém 6 mol/L de uréia, 2% (m/v) de SDS, 30% (v/v) de glicerol, 50 mmol/L de tris-HCl a 1,5 mol/L (pH 8,8), 0,002% de azul de bromofenol. Essa solução foi homogeneizada e adicionada à fita, onde foi mantida sob agitação leve por 20 minutos. Decorrido este período, a solução foi descartada. Posteriormente, 250 mg de iodoacetamida (agente alquilante; *GE Healthcare*) foram adicionados a 10 mL de solução de equilíbrio, homogeneizada e adicionada ao tubo com a fita, mantendo sob agitação por 20 minutos. A solução foi descartada. Em seguida, as fitas foram aplicadas em géis de poliacrilamida a 12,5% previamente preparados.

3.13.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Para comparação, a cada gel submetido à corrida eletroforética foram colocados 5 µL do padrão de massa molecular *(GE Healthcare)* contendo as proteínas β-fosforilase (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α-lactalbumina (14,4 kDa). Previamente à aplicação no gel, o peso molecular padrão foi aquecido em banho-maria por 5 minutos, conforme recomendação do fabricante. Após focalização e equilíbrio, as fitas e o padrão foram acomodados apropriadamente sob o gel. Em seguida, foi adicionada solução de agarose a 0,5% (m/v) levemente aquecida, para fixar as fitas no gel.

A segunda dimensão foi realizada para a separação das proteínas de acordo com a massa molecular. As condições eletroforéticas aplicadas como pH, força iônica e tampão estavam de acordo com as estabelecidas por Laemmli (1970). A solução tampão de corrida empregada no preenchimento dos reservatórios da cuba foi preparada por Tris-Base a 0,06 mol/L, glicina a 0,5 mol/L e SDS a 0,15% (m/v). Na corrida eletroforética foi fixada a corrente de 15 V durante 15 minutos, e 30 V por gel por aproximadamente 240 minutos. Os parâmetros elétricos foram fornecidos por uma fonte de alimentação. A separação eletroforética foi realizada mantendo-se a temperatura entre 6-10 °C para evitar distorções das bandas, e, consequentemente problemas de resolução.

Após a eletroforese, os géis foram corados usando solução Azul de Coomassie G-250 (Neuhoff, Arold *et al.*, 1988). O excesso da solução corante foi removido utilizando-se solução composta por água deionizada (75%), etanol (20%) e ácido acético glacial (5%). Foi feita troca dessa solução até que as bandas de proteínas fossem visualizadas.

Após coloração e descoloração do gel, as imagens dos géis foram adquiridas por scanner *(Amersham Bioscience)*. Em seguida, foi realizada a análise das imagens empregando-se o software *ImageMaster 2D Plattinum* (Genebio, Genebra, Suíça) versão 6.0 que permite estimar as massas moleculares e o ponto isoelétrico (pI) das proteínas, bem como o total de proteínas expressas em um gel.

3.13.10. Espectrometria de massas por MALDI TOF/TOF

As amostras foram devidamente preparadas para seqüenciamento. Foi utilizado o equipamento MALDI TOF/TOF 5800 *System* (*Applied Biosystems)* em colaboração com o Laboratório Estrutural de Biologia e Zooquímica, do Departamento de Biologia Celular e

Molecular do Instituto de Biociencias da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", sob supervisão do Prof. Dr. Mario Sérgio Palma. Os espectros obtidos foram processados utilizando o *Protein Pilot* e as sequências encontradas foram pesquisadas no Swiss *databank.*

3.13.11. Preparo dos *spots*

Os *spots* foram excisados dos géis, com auxilio de uma lâmina de bisturi. Os mesmos foram recortados e reduzidos em fragmentos de aproximadamente 1 mm^3 em placas de Petri de vidro, previamente tratadas com metanol, e então transferidos para microtubos. Os fragmentos de gel foram lavados três vezes ou até a remoção completa do corante com solução de descoloração (acetonitrila (ACN) 50% adicionado de bicarbonato de amônio AmBic 25 mM v/v). Após a descoloração, a solução foi removida. Adicionou-se 200 µL de ACN 100% por 10 minutos para a desidratação dos fragmentos. O resíduo remanescente do gel evaporou à temperatura ambiente, em capela de exaustão (15 a 20 minutos). Os fragmentos foram reidratados com 40 µL da solução de redução (ditiotreitol (DTT) 20 mM adicionado de AmBic 50 mM), as quais foram mantidas a 56˚C por 40 min. Em seguida os fragmentos foram cobertos com 40 µL da solução de alquilação (iodoacetamida 55 mM adicionado de AmBic 50 mM) e incubados ao abrigo da luz, à temperatura ambiente, por 30 minutos. Após esse período foi feita uma lavagem com 200 µL de Ambic 25 mM seguida de desidratação com 200 µL ACN 100%. O resíduo remanescente do gel evaporou à temperatura ambiente, em capela de exaustão (15 a 20 minutos).

3.13.12. Digestão tríptica

Foi adicionado a cada microtubo 10 µL da solução de tripsina (em AmBic 50 mM) sobre os fragmentos de géis desidratados, por 15 minutos a 4 ˚C, de forma a permitir que a tripsina penetre nos fragmentos de gel. Em seguida, 40 µL de Ambic 50 mM foram adicionados e as amostras foram incubadas a 37˚C, por 14 horas.

3.13.13. Eluição dos peptídeos

A ação da tripsina foi interrompida pela adição de 15 µL de solução bloqueadora (ácido fórmico 96 % mais ACN 50 %). Em seguida, o sobrenadante foi recuperado em um microtubo novo. Foram realizados mais dois passos de eluição envolvendo duas soluções diferentes (I: ácido fórmico 96% adicionado de metanol 100%, II: ácido fórmico 50% adicionado de ACN 100%). Em ambas as etapas, os fragmentos foram cobertos com quantidade suficiente da solução e sonicados por 15 minutos a 40˚C. O sobrenadante foi

transferido para o microtubo já reservado e previamente identificado. Esse processo foi realizado duas vezes para cada etapa. Uma terceira eluição foi feita adicionando quantidade suficiente de ACN 100% para a desidratação dos fragmentos. O sobrenadante foi transferido para os microtubos já reservados. A solução transferida para os microtubos contendo os peptídeos eluídos do gel foi concentrada em concentrador a vácuo (*SpeedVac*), à temperatura ambiente.

3.13.14. Dessalinização das amostras

No momento da análise, as amostras foram ressuspendidas em 10 µL de TFA 0,1 % em água MilliQ e sonicadas a 20-25˚C, por 5 minutos e então passadas por $ZipTip_{U\text{-}C18}$ (Millipore) e transferidas para um novo microtubo.

3.13.15. Aplicação das amostras na placa de MALDI-TOF/TOF

Inicialmente 1 µL de cada amostra foi transferido para a placa de MALDI. Após a secagem da mesma foi adicionado mais 1 µL de cada uma das amostras. Após a secagem das amostras e aplicação da matriz, a placa foi posicionada no equipamento de espectrometria de massas para MALDI-TOF/TOF.

4. RESULTADOS:

4.1. Determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) dos antifúngicos comerciais

A figura 06 e tabela 01 demonstram os resultados do teste de microdiluição obtidos com os agentes antifúngicos comerciais anfotericina B e itraconazol. Estes antifúngicos foram testados com os isolados de *Paracoccidioides spp,* onde o isolado 18 apresentou valores de CIM iguais a 0,125 µg/mL para anfotericina B e 0,02 µg/mL para itraconazol e o isolado 02 apresentou valores de CIM iguais a 0,125 µg/mL e 0,008 µg/mL, respectivamente. O isolado 01 de *P. lutzii* (Pb 01) apresentou valores iguais a 0,06 e 0,02 µg/mL, descrito na tabela 01 além das outras duas linhagens. Os resultados são expressos em triplicata e independentes.

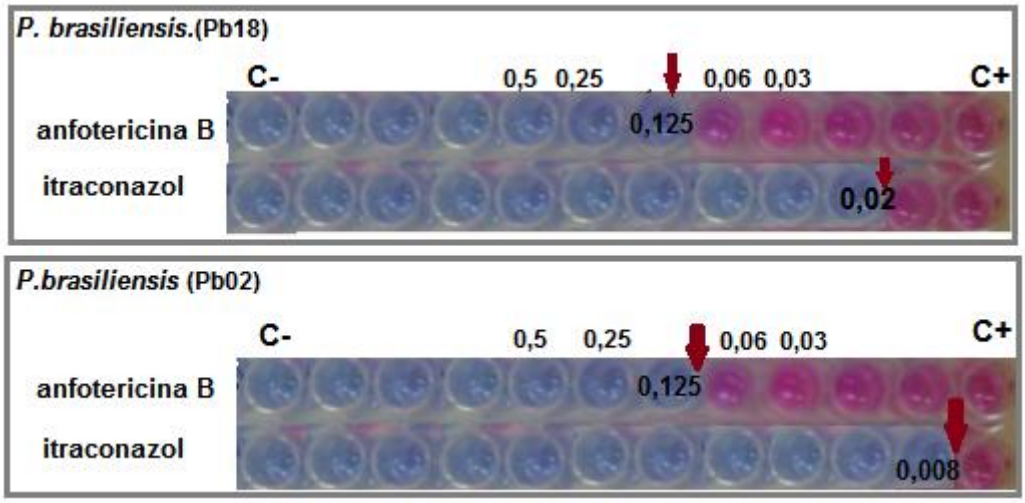


Figura 06. Determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) por microdiluição contra o Isolado de *Paracoccidioides ssp* (espécies filogenéticas S1 e S2, isolado Pb18 e Pb02 respectivamente) expressas em µg/mL, os resultados foram obtidos em triplicata por ensaios independentes.

Farmácos	***P.brasiliensis*, Pb18 CIM (µg/mL)/ (µmol L^{-1})**	***P.brasiliensis* Pb02 CIM (µg/mL)/ (µmol L^{-1})**	***P. lutzii* isolated01, Pb 01 CIM(µg/mL)/ (µmol L^{-1})**
anfotericina B	0,125 (0,14)	0,125 (0,14)	0,06 (0,064)
itraconazol	0,02 (0,03)	0,008 (0,01)	0,02 (0,03)

Tabela 01: Determinação da CIM por microdiluição para Anfotericina B e Itraconazol para os isolados do Complexo *Paracoccidoides spp (*espécies filogenéticas S1 e S2, isolado Pb18 e Pb02, respectivamente) e *P. lutzii* (isolado Pb 01), expressas em µg/mL e os resultados foram obtidos em triplicata por ensaios independentes.

Foi realizado o teste de sensibilidade utilizando o dimetilsulfóxido (DMSO), que é o solvente padrão dos antifúngicos utilizados, recomendado pelo documento M27A3 do CLSI.

A Figura 07 demonstra o teste de sensibilidade realizado em placa de microdiluição para a determinação da concentração ideal de DMSO para a diluição dos antifúngicos, a concentração ideal apresentou um valor de CIM de aproximadamente 3,125%.

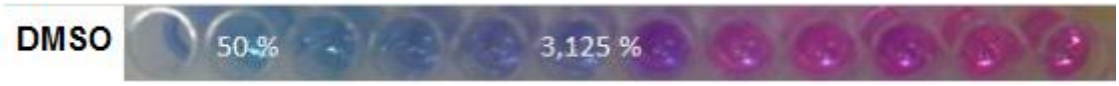


Figura 07. Determinação da CIM para o solvente DMSO para isolado de *Paracoccidioides spp.*

4.2. Triagens de substâncias vegetais

4.2.1. Determinação da CIM das Chalconas

Nas tabelas (Tabelas 02 a 04), Se observaram a avaliação da atividade antifúngica das diferentes chalconas 4'- hidroxichalcona (4'-chalc), 2'- hidroxichalcona (2'-chalc), 2-hidroxichalcona (2-chalc), 2,5- diidroxichalcona (2,5-chalc) (estas substâncias foram denominadas como estão no parêntesis para facilitar de agora em diante) assim foi realizada com finalidade de verificar a atividade antifúngica das mesmas, desta forma sua ação foi avaliada para o *P. brasiliensis* (isolados Pb18 e Pb02) e *P. lutzii* (isolado Pb 01).

Os resultados observados de CIM para os três isolados variam de 0,12 μg/mL (0,53 μmol L^{-1}) a 31,25 μg/mL (139,5 μmol L^{-1}). Os melhores resultados foram para a (2-chalc) com valores de CIM de 0,12 μg/mL(0,53 μmol L^{-1}) para Pb02 e para Pb 18 e Pb 01 foram de 0,97 μg/mL (4,3 μmol L^{-1}), os valores de IS (índice de Seletividade) que é a relação IS = IC_{50}/CIM . Quanto maior o IS mais segura é a substância.

Os valores foram (513 para Pb 02 e 63,4 para Pb 18 e Pb01). Demonstrando que a (2-chalc) é uma substância antifúngica potente e com baixa citotoxicidade (estes dados são observados nas figuras). Os dados foram realizados em triplicata e independentes.

Chalconas	*Paracoccidioides brasiliensis* (isolado 18, Pb18) CIM µg/mL/ (µmol L^{-1})	CI_{50} (µg/mL)	IS (CI_{50}/CIM)
4'- chalc	0,97 (4,3)	59,5	61,3
2,5 – chalc	0,97 (4,0)	8,1	8,4
2´ – chalc	0,48 (2,1)	66,8	139
2 – chalc	0,97 (4,3)	61,5	63,4
anfotericina B	0,125 (0,14)	0,22	1,8
itraconazol	0,02 (0,03)	0,1	5,0

Tabela 02. Determinação da CIM das Chalconas, para o, isolado Pb18, (CIM) expressa em µg/mL e µmol L^{-1}, CI_{50} (concentração que inibe 50% para a linhagem MRC5 e IS (Índice de Seletividade) que é a relação de IS=(CI50/CIM), resultados expressos em triplicata e independentes

chalconas	*Paracoccidioides brasiliensis*, (isolado 02, Pb02) CIM µg/mL/ (µmol L^{-1})	CI_{50} (µg/mL)/	IS (CI_{50}/CIM)
4´- chalc	0,24 (1,1)	59,5	248
2´ – chalc	0,48 (2,1)	66,8	139
2 – chalc	0,12 (0,53)	61,5	513
2,5 – chalc	0,24 (1,0)	8,1	33,8
anfotericina B	0,125 (0,14)	0,22	1,8
itraconazol	0,02 (0,03)	0,1	12,5

Tabela 03. Determinação da CIM das Chalconas, para o Isolado, Pb02 CIM expressa em µg/mL, CI_{50} para a linhagem MRC5; e IS (Índice de Seletividade), resultados expressos em triplicata e independentes.

chalconas	*Paracoccidioides lutzii* isolado 01, Pb 01 CIM µg/mL/ (µmol L^{-1})	CI_{50} (µg/mL)/	IS(CI_{50}/CIM)
2-Chalc	0,97 (4,3)	61,5	63,4
2´ Chalc	31,25 (139,5)	66,8	2,1
2,5 Chalc	15,6 (65)	8,1	0,5
4´ Chalc	1,9 (8,5)	59,5	31,3
anfotericina B	0,125 (0,14)	0,22	1,8
itraconazol	0,02 (0,03)	0,1	1,0

Tabela 04. Determinação da CIM das Chalconas, para o Isolado Pb01, CIM expressa em µg/mL CI_{50}para a linhagem MRC5; e IS (Índice de Seletividade), resultados expressos em triplicata e independentes.

4.2.2. Determinação da CIM dos protocatecuatos

A avaliação da atividade antifúngica dos protocatecuatos (hexila, heptila, octila, nonila, decila e dodecila) foi realizada com finalidade de verificar a atividade antifúngica. Desta forma, sua ação foi avaliada para os isolados de Pb18, 02 e 01, como controles foram utilizadas a anfotericina B e itraconazol, padronizadas previamente.

Os resultados observados para os três isolados os valores de CIM variam de 0,24 µg/mL (0,7 µmol L^{-1}) a 7,8 µg/mL (33,8 µmol L^{-1}). Os melhores resultados foram obtidos para o dodecila com valores de CIM de 0,24 µg/mL(0,7 µmol L^{-1}) e 0,48 µg/mL (1,5 µmol L^{-1}) para Pb02 e Pb 18, Pb 01 respectivamente, obtendo valores de IS (índice de Seletividade) que é a relação IS = IC_{50}/CIM. Valores acima de 10 que são consideradas substâncias seguras, quanto maior o IS mais segura é a substância. Os valores foram (74,7 e 37,3) respectivamente mostrando que o dodecila é uma substância altamente eficaz e segura. Estes dados são observados nas tabelas 05 a 07 dados expressos em triplicata e independentes.

protocatecuatos	*Paracoccidioides brasiliensis* (isolado 18, Pb18) CIM µg/mL/ (µmol L^{-1})	CI_{50} (µg/mL)	IS (CI_{50}/CIM)
hexila	3,9 (16,4)	29,5	7,5
heptila	7,8 (30,9)	17,6	2,3
octila	0,97 (3,6)	33,7	34,7
nonila	1,9 (6,8)	17,7	9,3
decila	0,97 (3,3)	16	16,5
dodecila	0,48 (1,5)	17,9	37,3
anfotericina B	0,125 (0,14)	0,22	1,8
itraconazol	0,02 (0,03)	0,10	5,0

Tabela 05. Determinação da CIM dos protocatecuatos, para o, isolado Pb18, (CIM) expressa em µg/mL e µmol L^{-1}, CI_{50} (concentração que inibe 50% para a linhagem MRC5 e IS (Índice de Seletividade) que é a relação de IS=(CI50/CIM), resultados expressos em triplicata e independentes

protocatecuatos	*Paracoccidioides brasiliensis*, (isolado 02, Pb02) CIM µg/mL/ (µmol L^{-1})	CI_{50} (µg/mL)	IS (CI_{50}/CIM)
hexila	1,9 (8,0)	29,5	15,5
heptila	0,24 (1,0)	17,6	73,3
octila	1,9 (7,1)	33,7	17,7
nonila	0,48 (1,8)	17,7	36,9
decila	0,48 (1,6)	16	33,3
dodecila	0,24 (0,7)	17,9	74,7
anfotericina B	0,125 (0,14)	0,22	1,8
itraconazol	0,008 (0,01)	0,1	12,5

Tabela 06. Determinação da CIM dos protocatecuatos, para o, isolado Pb 02, (CIM) expressa em µg/mL e µmol L^{-1}, CI_{50} (concentração que inibe 50% para a linhagem MRC5 e IS (Índice de Seletividade) que é a relação de IS=(CI50/CIM), resultados expressos em triplicata e independentes

protocatecuatos	*Paracoccidioides lutzii* isolado 01, Pb 01 CIM µg/mL/ (µmol L^{-1})	CI_{50} (µg/mL)	IS (CI_{50}/CIM)
hexila	7,8 (32,8)	29,5	3,8
heptila	3,9 (15,5)	17,6	4,5
octila	0,97 (3,6)	33,7	34,7
nonila	0,97 (3,5)	17,7	18,2
decila	1,9 (6,4)	16	8,4
dodecila	0,48 (1,5)	17,9	37,3
anfotericina B	0,06 (0.06)	0,22	3,7
itraconazol	0,12 (0,17)	0,10	1,0

Tabela 07. Determinação da CIM dos protocatecuatos, para o, isolado Pb01, (CIM) expressa em µg/mL e µmol L^{-1}, CI_{50} (concentração que inibe 50% para a linhagem MRC5 e IS (Índice de Seletividade) que é a relação de IS=(CI50/CIM), resultados expressos em triplicata e independentes

4.2.3 Ensaio de citotoxicidade da anfotericina B e itraconazol

Realizou-se ensaios de citotoxicidade, foi realizado para o ensaio de método de Sulforodamida B a 0,1% na linhagem Celular de MRC5 (pneumocitos humanos normais) para os fármacos controles anfotericina B e itraconazol. Os dados foram analisados nos valores do CIM (0,12 e 0,02 µg/mL). Os resultados obtidos foram de 69% e 67% em media de viabilidade celular respectivamente, o controle positivo foi a cumarina com um valor de 37% de viabilidade celular, através da avaliação estatística os valores tiveram diferença significante quando comparados os fármacos com o controle positivo (p<0,05*). Os resultados foram expressos em triplicata, podem ser observados na Figura 08.

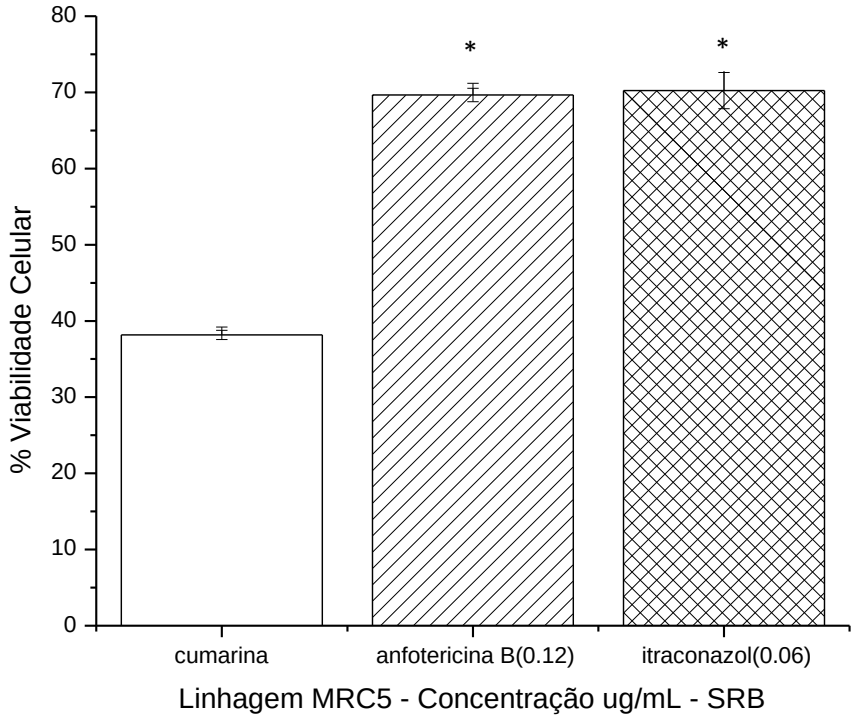


Figura 08. Viabilidade Celular frente à linhagem frente à linhagem celular de pneumócitos humanos normais (MRC5) da anfotericina e itraconazol nos seus valores de CIM foram determinado pelo método de sulforodamida B, controle positivo cumarina ($p<0,05$*), os resultados foram expressos em triplicata.

4.2.4. Ensaio de citotoxicidade das chalconas

Os ensaios para avaliação do potencial citotóxico das Chalconas: 4'- hidroxichalcona (4'-chalc), 2'- hidroxichalcona (2´-chalc), 2– hidroxichalcona (2–chalc), 2,5– diidroxichalcona (2,5– chalc), foram realizados pelos métodos de MTT que é o sal tetrazólio e sulforodamida B a 0,1% em linhagens celulares de NOK (queratinócitos de mucosa oral).

Os resultados foram observados na Figura 09, onde os valores foram expressos em % de viabilidade celular em função dos CIM das substancias testadas e foram 4'-Chalc CIM de (0,97 μg/mL) foi de 95%, para 2'-Chalc para o CIM de (0,48 μg/mL) foi de 94%, 2- Chalc (0,97 μg/mL) foi de 97% e para 2,5-Chalc (0,97 μg/mL) foi de 100% de viabilidade celular, respectivamente frente a linhagem de *Paracoccidioides brasiliensis (*espécie filogenética S1 Pb18). Desta forma se observou uma baixa citotoxicidade já que todas as substâncias mostraram valores acima de 90% de viabilidade celular.

Também se realizou ensaios de citotoxicidade por meio do método de Sulforodamida B a 0,1% na linhagem Celular de NOK (queratinócitos de mucosa oral) para 2'-chalc e

2-chalc nos valores do CIM (0,48 e 0,97 μg/mL) os resultados obtidos foram de 77% e 90% de viabilidade celular, respectivamente e os controles positivos para ambos os métodos foram o H_2O_2 com valores de 56% de viabilidade celular observados na Figura 10.

Através da avaliação estatística os valores tiveram diferença significante quando comparados as substâncias com o controle positivo (p<0,01**) e quando se comparou entre as chalconas não mostraram diferença significante para ambos os métodos, os resultados foram expressos em triplicata.

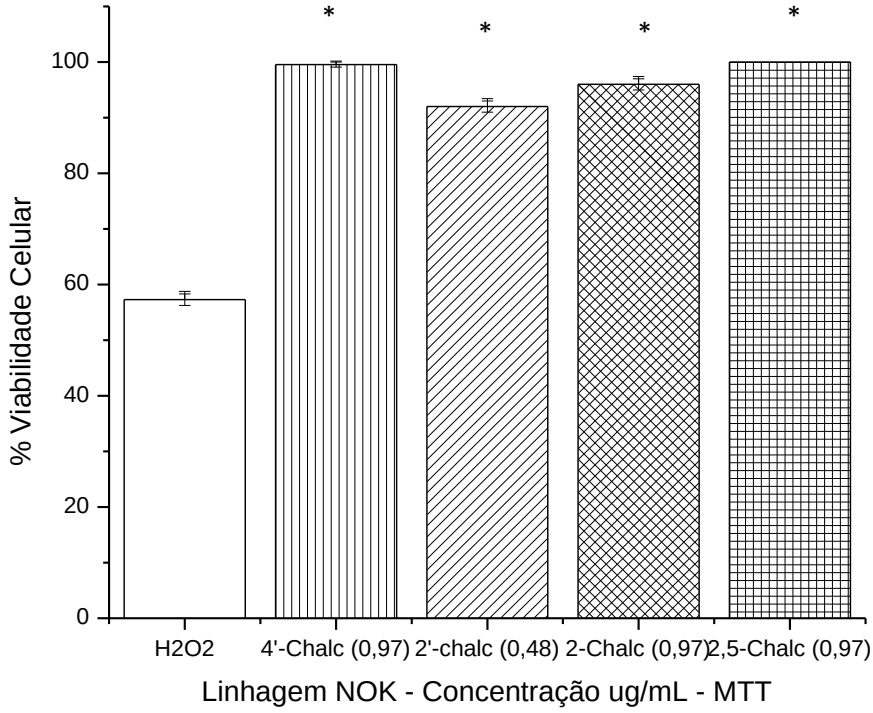


Figura 09. Porcentagem de Viabilidade Celular, frente à linhagem celular de queratinócito bucal, (NOK) das diferentes chalconas (4'-Chalc, 2'-Chalc, 2-Chalc, 2.5-Chalc) nos seus valores de CIM, determinados pelo método do MTT controle positivo o H_2O_2, (p<0,05*), os resultados foram expressos em triplicata.

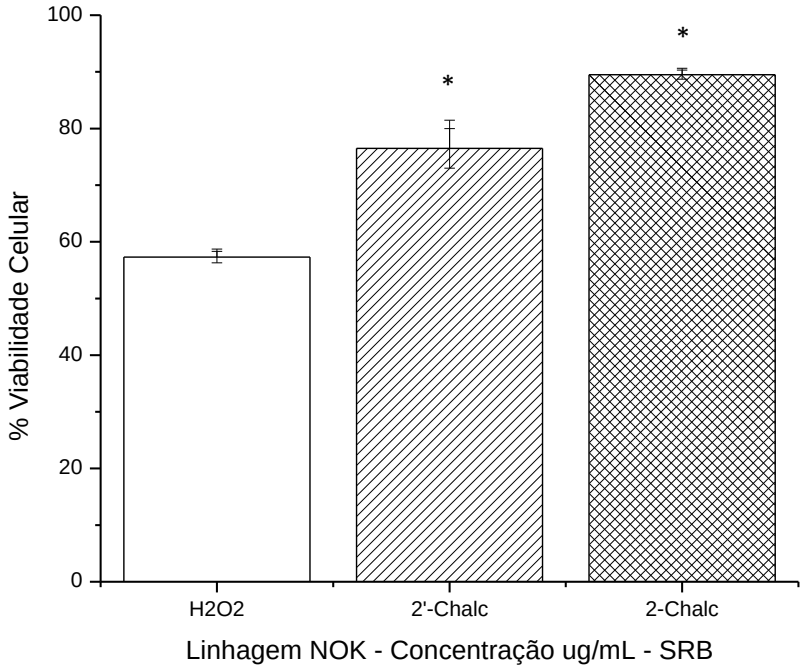


Figura 10. Porcentagem de Viabilidade Celular, frente à linhagem celular de queratinócito bucal, (NOK) das diferentes chalconas (4'-Chalc, 2'-Chalc, 2-Chalc, 2.5-Chalc) nos seus valores de CIM,determinado pelo método do SRB controle positivo o H_2O_2, ($p<0,05$*) os resultados foram expressos em triplicata.

4.2.5. Ensaio de citotoxicidade dos protocatecuatos

Os ensaios para avaliação da citotoxicidade dos protocatecuatos (Hexila (Hex), Heptila (hep), octila (oct), nonila (noni), decila (decil) e dodecila (dode) foram realizados pelo método de sulforodamida B a 0,1% nas linhagens celulares MRC5 (pneumócitos humanos), A549 (pneumócitos humanos células cancerígenas) e NOK (queratinócitos de mucosa oral).

Os resultados foram observados na Figura 11, onde os valores foram expressos em % de viabilidade celular em função dos CIM dos protocatecuatos testados frente a linhagem MRC5 (pneumócitos humanos) os CIMs observados hex (3,9 μg/mL) foi de 99%, para hep (7,8 μg/mL) foi de 65%, oct (0,97 μg/mL) foi de 98%, noni (1,9 μg/mL) foi de 96% deci (0,97 μg/mL) e para dode (0,48 μg/mL) foi de 98% de viabilidade celular respectivamente, assim para a linhagem A549 (pneumócitos humanos células cancerígenas) se observaram valores que variam de 70% a 97% sendo o menor valor para o protocatecuato de heptila e o maior para o Octila observados na Figura 12 já para a linhagem NOK (queratinócitos de mucosa oral) os valores observados variam de 64% a 100% sendo o menor valor para o heptila e o

maior para o protocatecuato octila, respectivamente podem ser vistas na Figura 13, apresentaram uma alta viabilidade celular, o que as torna substâncias muito promissoras.

Os controles positivos para todas as linhagens foram o H_2O_2 com valores de 38 a 56% e a cumarina com 37% de viabilidade celular. Através da avaliação estatística os valores tiveram diferença significante quando comparados às substâncias com o controle positivo (p<0,01**) para a linhagem MRC5 e A549, assim para NOK mostrou uma diferença significante de (p<0,05*), quando se comparou entre os ácidos não mostraram diferença significante para todas as linhagens, os resultados foram expressos em triplicata.

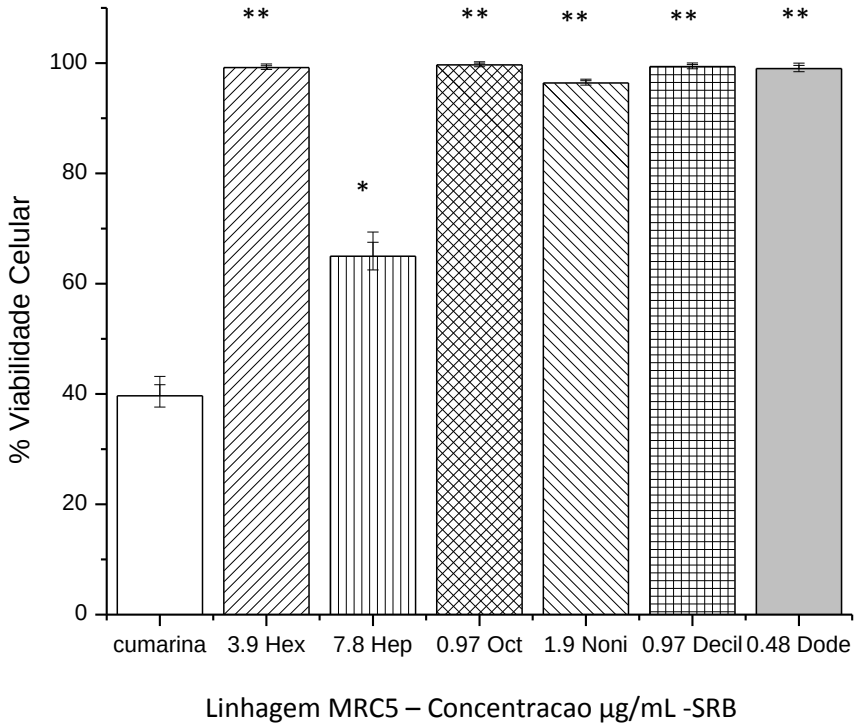


Figura 11. Porcentagem de Viabilidade Celular frente à linhagem celular de pneumócitos humanos normais (MRC5) dos diferentes protocatecuatos de (hexila, heptila, octila, nonila, decila e dodecila) nos seus valores de CIM foram determinado pelo método de sulforodamida B, controle positivo cumarina. (p<0,01**), os resultados foram expressos em triplicata.

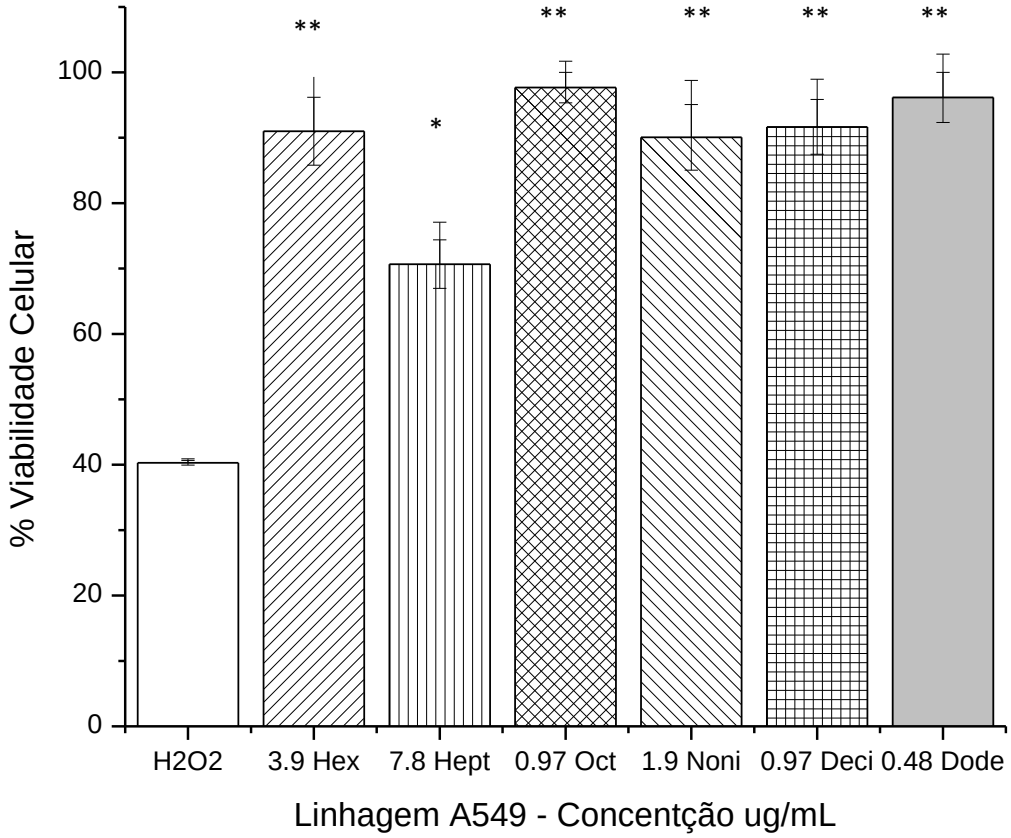


Figura 12. Porcentagem de Viabilidade Celular frente à linhagem celular de pneumócitos humanos Cancerigenas (A549) dos diferentes protocatecuatos de (hexila, heptila, octila, nonila, decila e dodecila) nos seus valores de CIM foram determinado pelo método de sulforodamida B, controle positivo H_2O_2 ($p<0,01$**), os resultados foram expressos em triplicata.

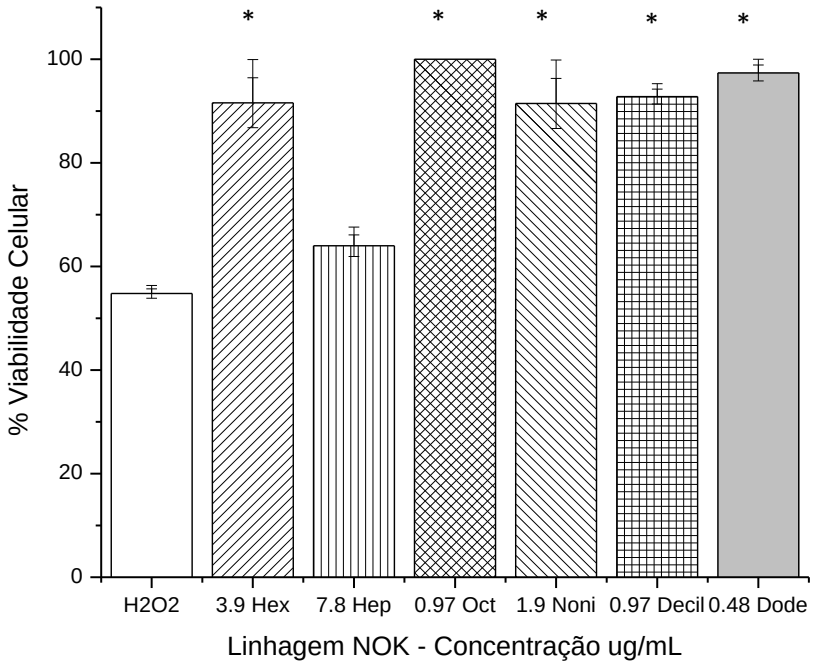


Figura 13. Mostra a porcentagem de Viabilidade Celular frente à linhagem celular de queratinócito bucal, (NOK) dos diferentes protocatecuatos de (hexila, heptila, octila, nonila, decila e dodecila) nos seus valores de CIM foram determinado pelo método de sulforodamida B, controle positivo H_2O_2 ($p<0,01$**), os resultados foram expressos em triplicata.

4.3. Caracterização físico química:

4.3.1. Caracterização do diâmetro e do índice de polidispersão das nanoparticulas

A caracterização do diâmetro e dos valores do índice de polidispersão (PDI) são observados na Tabela 08 Fig14 a 19, com um valor médio de 151 nm e de 0,16, para o SNL (sistema nanoestruturado lipídico), com 152,55 nm e 0,12, para SNL + 2-hidroxichalcona; (SNL + 2-chalc), com 145,88 nm e 0,11 para SNL + 2'-hidroxichalcona; (SNL + 2'-chalc), com 147,82 nm e 0,13 para o SNL+ protocatecuato de dodecila; (SNL+dodecila), 149,43 nm e 0,13 para SNL+ protocatecuato decila (SNL+decila) e com valores médios de 156,22 nm e 0,12 para (SNL + anfotericina), valores referidos ao tamanho de partícula e ao índice de polidispersão respectivamente das substâncias incorporadas no sistema nanoestruturado Lipídico os quais serão expressos daqui para frente da forma já descrita.

As amostras foram medidas em triplicata com 10 medições por amostra. As amostras foram analisadas por Zetasizer Nano ZS-analisador de partículas Malvern Instruments, acoplados a um titulador multiusos.

Amostras	Diametro ± SD (nm)	PDI± SD
SNL(Sistema nanoetruturado lipídico)	151,22 ± 0,60	0,16 ± 0,13
SNL+ 2-chalc	152,55 ± 0,45	0,12 ± 0,07
SNL+2´-chalc	145,88 ± 0,32	0,11 ± 0,09
SNL+ dodecila	147,82 ± 0,43	0,13 ± 0,09
SNL+decila	149,43 ± 0,47	0,13 ± 0,09
SNL+ amphotericina B	156,22 ± 0,52	0,12 ± 0,02

Tabela 08. Avaliação do tamanho das partículas e do índice de polidispersão (PDI) do sistema nanoestruturado lipídico (SNL) e das substâncias incorporadas nele para 2-chalc, 2´-chalc, dodecila, decila e anfotericina B incorporada no sistema nanoestruturado lipídico (SNL). Desvio Standar padrão (SD), média de10 determinações. em triplicata e independentes.

.

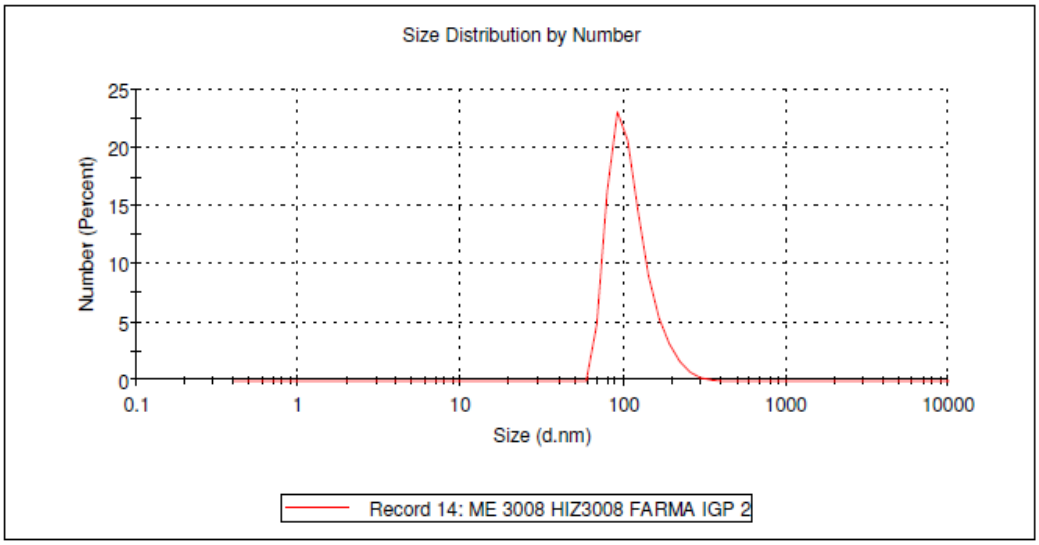


Figura 14. Efeito do tamanho de partícula do sistema nanoestruturado SNL, média de 10 determinações (tabela 08).

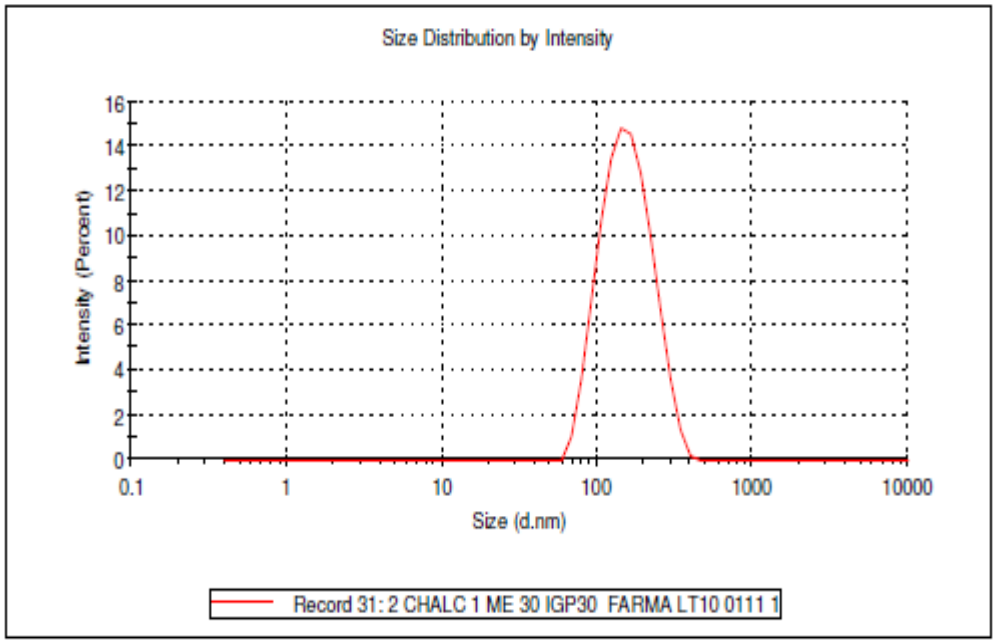


Figura 15. Efeito do tamanho de partícula da SNL+2-chalc, média de 10 determinações (tabela 08).

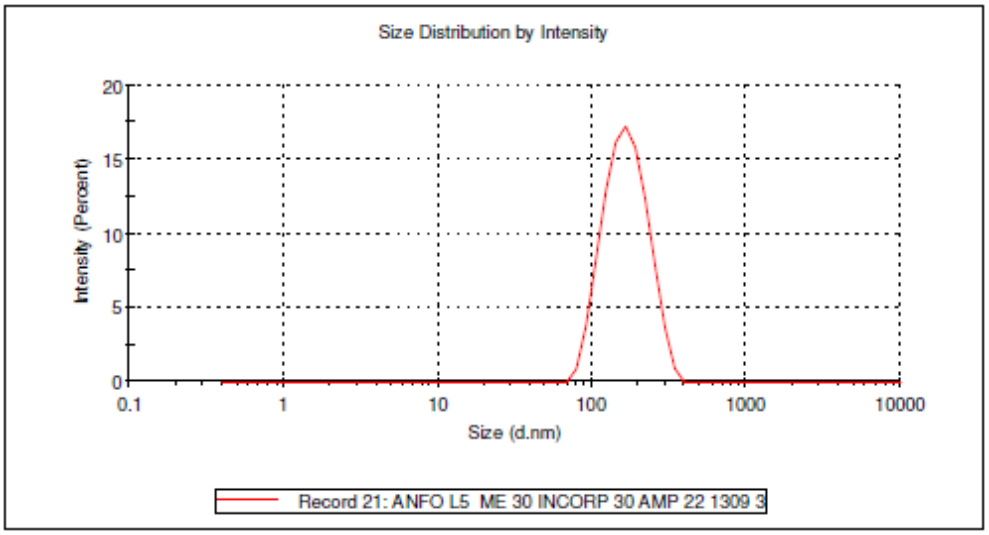


Figura 16. Efeito do tamanho de partícula da SNL+anfotericina B, média de 10 determinações (tabela 08).

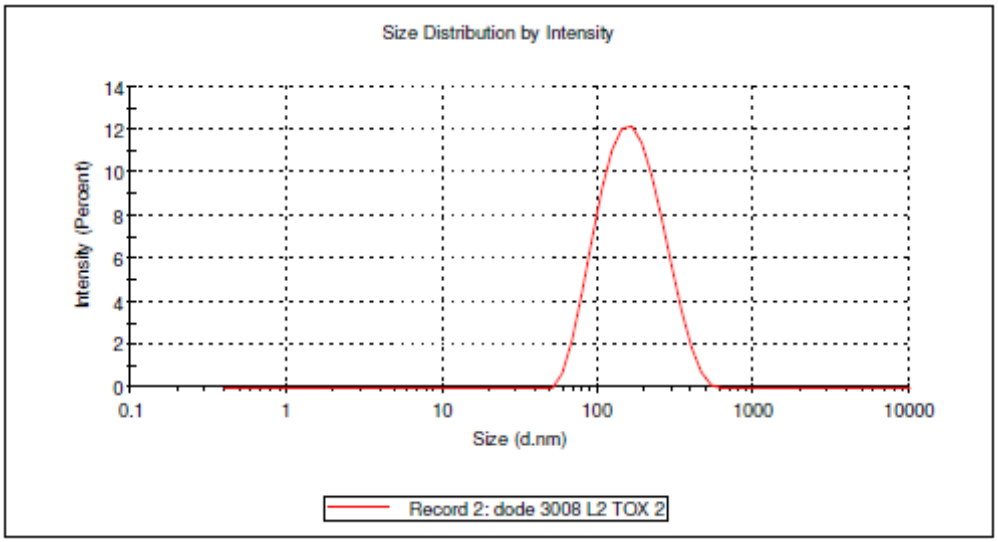


Figura 17. Efeito do tamanho de partícula da SNL+dodecila, média de 10 determinações (tabela 08).

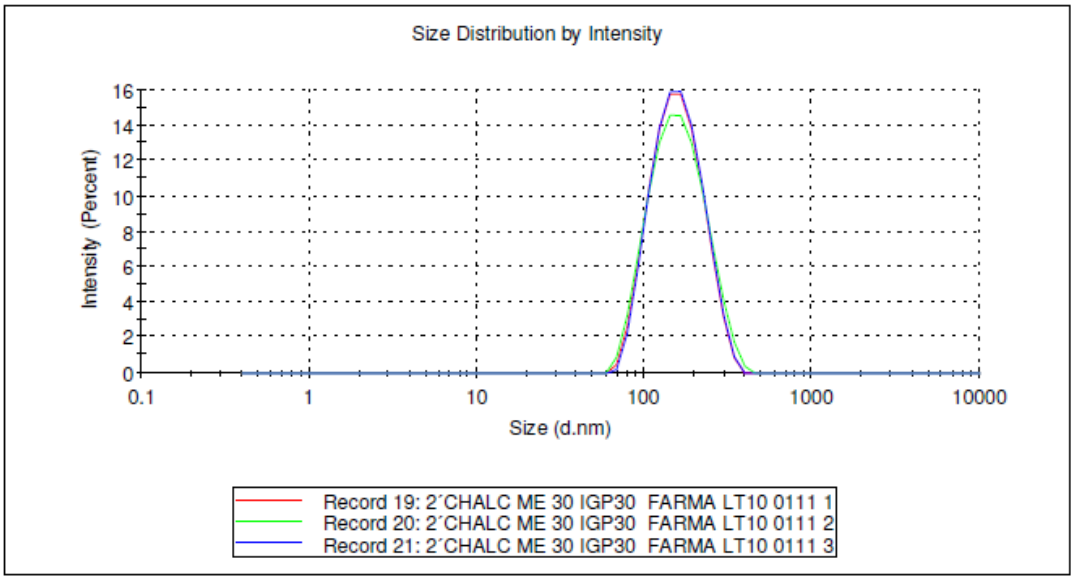


Figura 18. Efeito do tamanho de partícula da SNL+2'-chalc, média de 10 determinações (tabela 08).

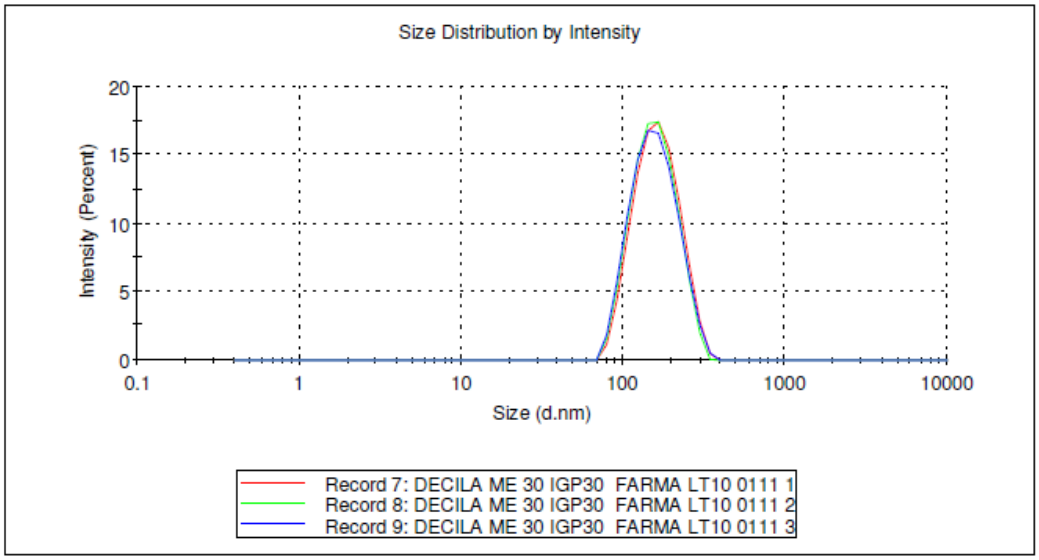


Figura 19. Efeito do tamanho de partícula da SNL+decila, média de 10 determinações (tabela 08).

4.3.2. Determinação do potencial zeta das nanopartículas

Os valores do potencial zeta obtidos são observados na tabela 09 com um valor médio de -58,30 para SNL, com -65,31 para SNL+2-chalc, com -55,47 para SNL+2'-chalc, com -68,12 para SNL + dodecila, com -61,52 para SNL+ decila e com -56,70 para SN + anfotericina, respectivamente. As amostras foram medidas em triplicata com 10 medições por amostra. Foram analisadas pelo analisador de partículas Nano Zetasizer-ZS, Malvern Instruments acoplado a um titulador multiusos.

Amostras	Potencial zeta ±SD
SNL(Sistema nanoetruturado lipídico)	- 58,30 ± 1,04
SNL+ 2-chalc	- 65,31 ± 1,83
SNL+2´-chalc	- 55,47 ± 1,85
SNL+ dodecila	- 68,12 ± 1,26
SNL+decila	- 61,52 ± 2,56
SNL+ amphotericina B	- 57,63 ± 0,68

Tabela 09. Avaliação de pontencial zeta do sistema nanoestruturado lipídico (SNL) e das substâncias incorporadas nele para 2-chalc, 2´-chalc, dodecila, decila e anfotericina B incorporada no sistema

nanoestruturado. Desvio Standar padrão (SD), média de10 determinações. em triplicata e independentes.

4.3.3. Determinação da morfologia do Sistema Nanoestruturado Lipídico e das substâncias incorporadas através da microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo

A fim de determinar a morfologia do sitema nanoestruturado. As Figuras 20 a 26 mostram as fotomicrografias das amostras (sistema nanoestruturado lipídico, SNL+ 2-chalc, SNL + dodecila e SNL+decila), visão panorâmica e nanopartículas isoladas, com um aumento que variam de x40 a x 170.000 vezes, foi usado um microscópio eletrônico de varredura de emissão de campo, modelo JEOL JSM-7500F.

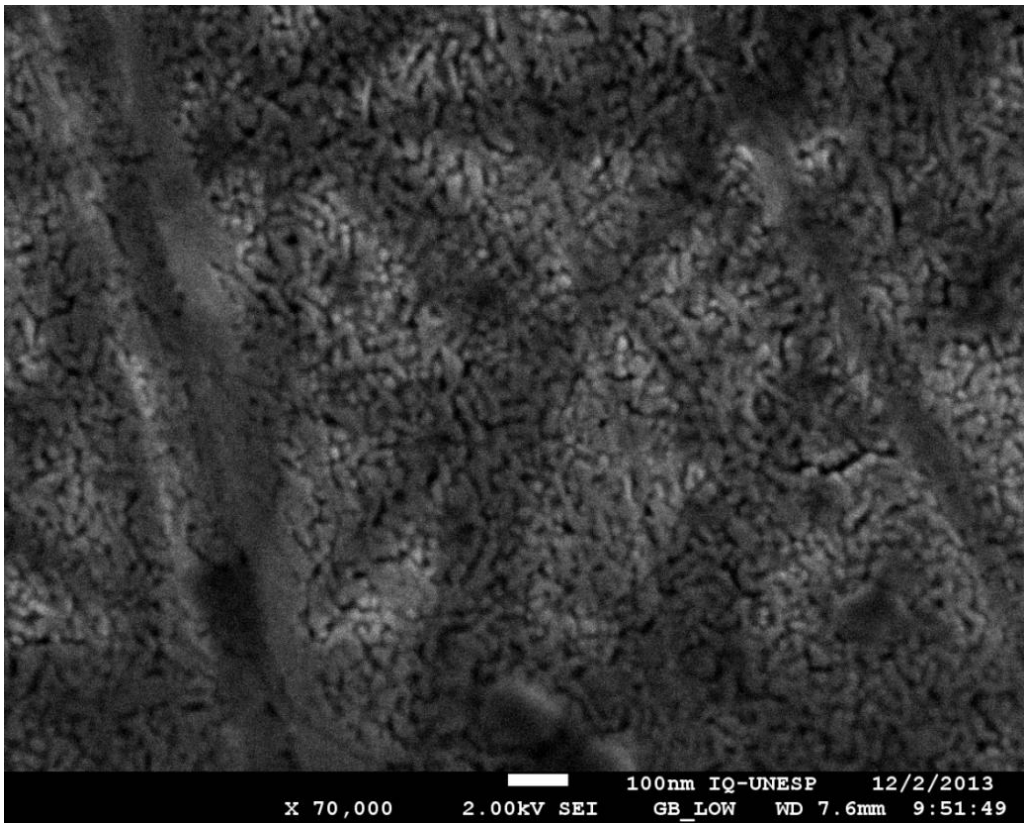


Figura 20. Fotomicrografia de campo de varredura de emissão de microscopia eletrônica para da SNL (Sistema Nanoestruturado Lipídico**)**, com um aumento x 70,000, visão panorâmica.

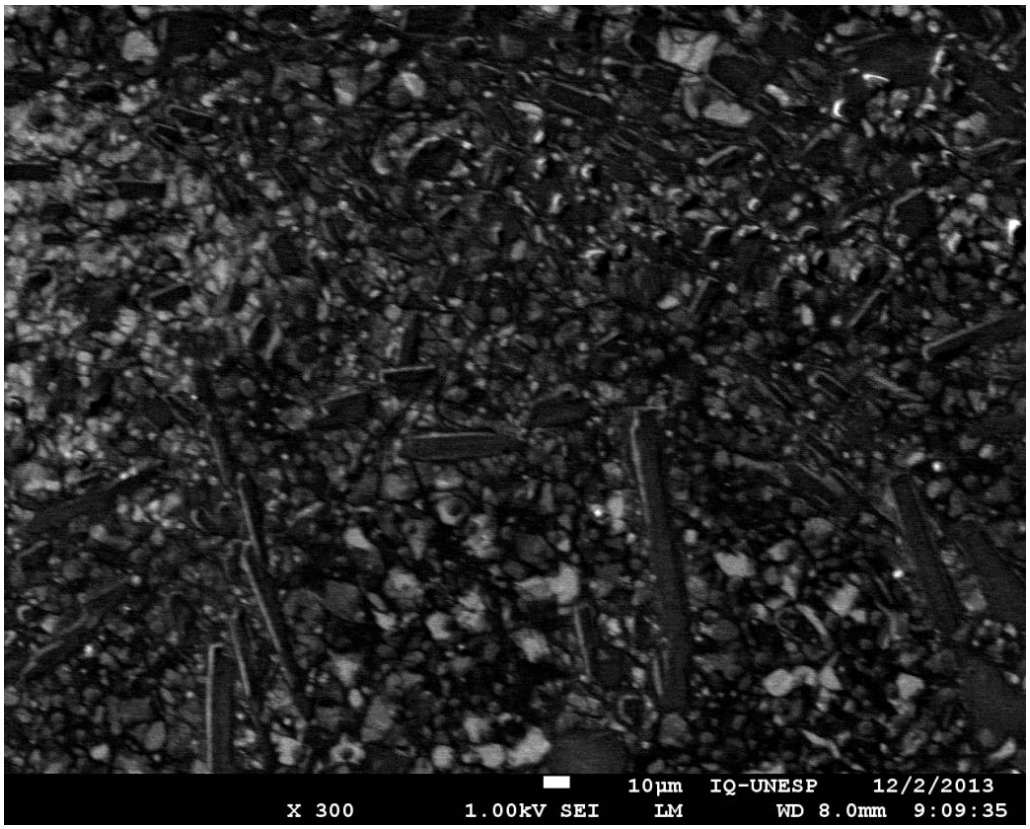


Figura 21. Fotomicrografia de campo de varredura de emissão de microscopia eletrônica para da SNL+ 2-chalc, com um aumento x 300, visão panorâmica.

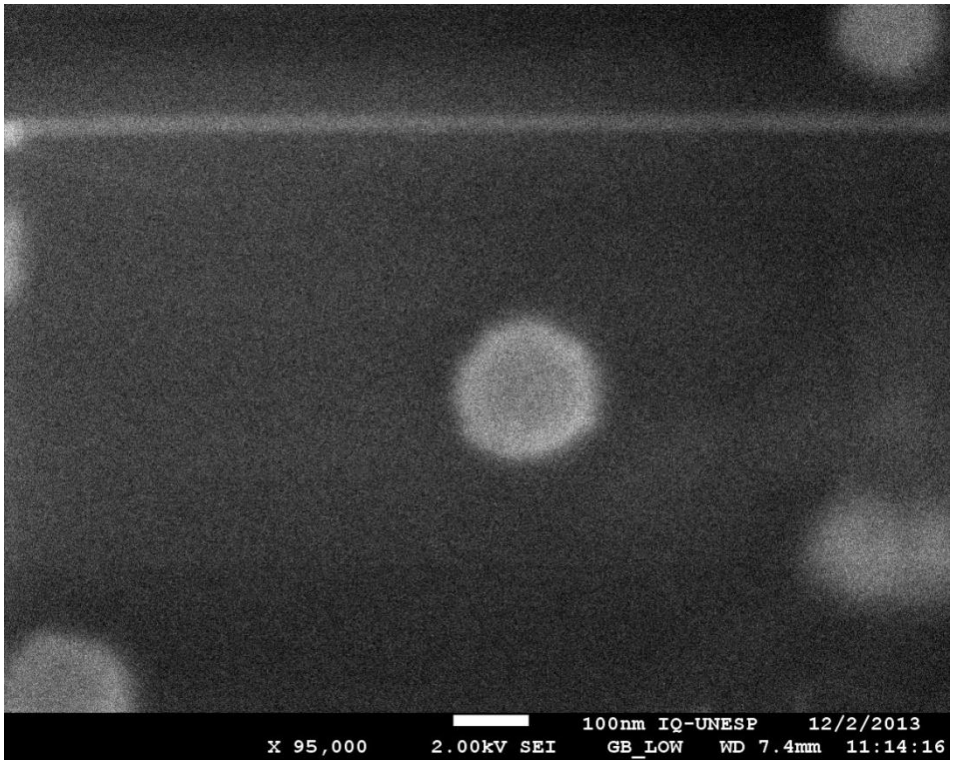


Figura 22. Fotomicrografia de campo de varredura de emissão de microscopia eletrônica para da SNL+ 2-chalc, com um aumento x 95,000, isolando uma partícula.

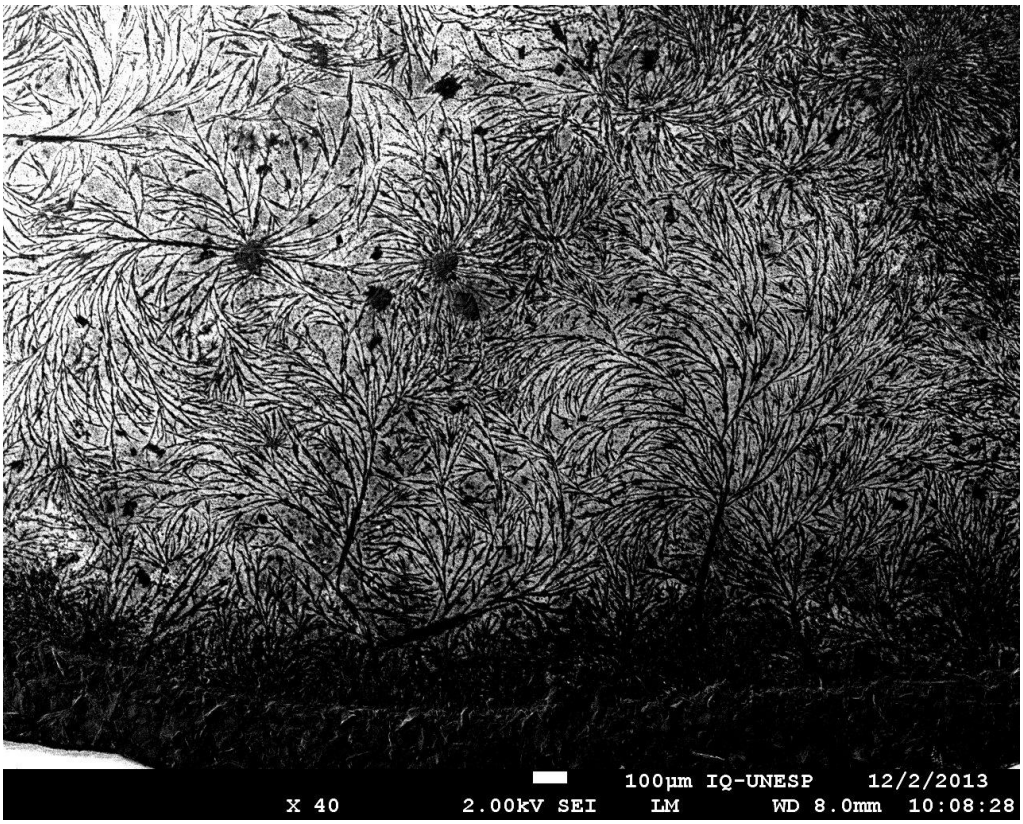


Figura 23. Fotomicrografia de campo de varredura de emissão de microscopia eletrônica para da SNL+ dodecila, com um aumento x 40, visão panorâmica.

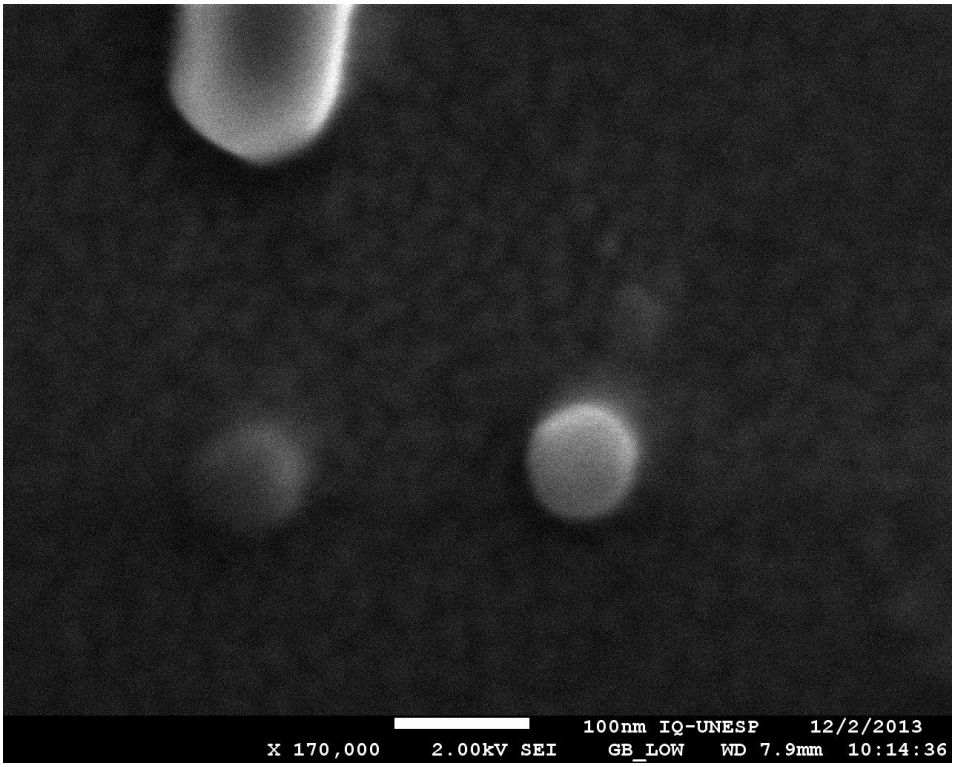


Figura 24. Fotomicrografia de campo de varredura de emissão de microscopia eletrônica para da SNL+ dodecila, com um aumento x 170,000, isolando as partículas.

.

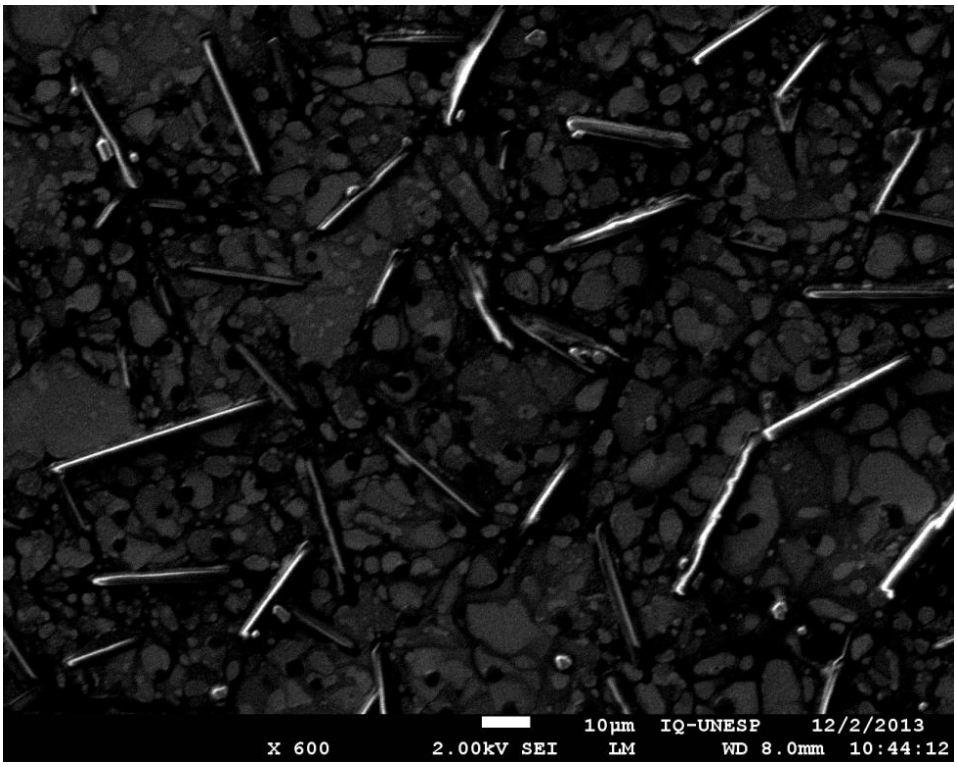


Figura 25. Fotomicrografia de campo de varredura de emissão de microscopia eletrônica para da SNL+ decila, com um aumento x600, visão panorâmica.

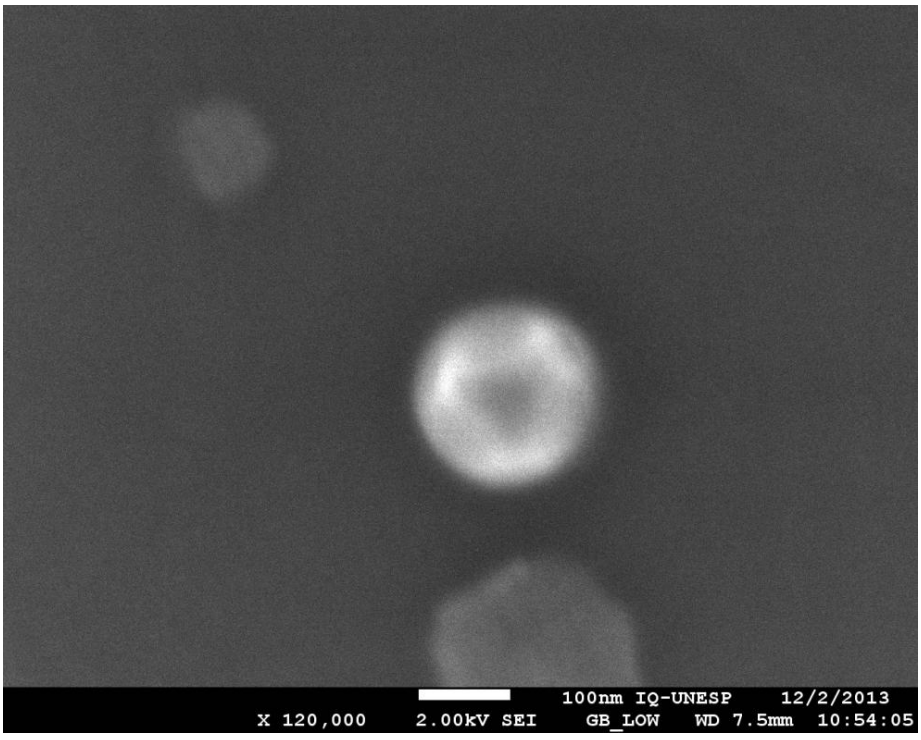


Figura 26. Fotomicrografia de campo de varredura de emissão de microscopia eletrônica para da SNL+ decila, com um aumento x 120,000, isolando uma partícula.

4.4. Determinação da CIM das chalconas e protocatecuatos incorporadas no sistema nanoestruturado lipídico

A avaliação da atividade antifúngica das substâncias incorporada no sistema nanoestruturado (2'-hidroxichalcona (2'chalc), 2- hidroxichalcona (2-chalc), protocatecuato decila (decila) e protocatecuato de dodecila (dode) foi realizada com finalidade de verificar se houve potencialização da atividade antifúngica das substâncias em estudo, contra as cepas *Paracoccidioides brasiliensis* (isolados Pb18, Pb02) e *P. lutzii* isolado 01, (Pb 01), como controle, foi usado o farmáco anfotericina B incorporado no sistema nanoestruturado lipídico da mesma forma com as substâncias.

Os resultados observados a partir das substâncias incorporadas no sistema nanoestruturado lipídico para as três linhagens de CIM variam de 0,06 μg/mL (0,27 μmol L^{-1}) a 0,0076 μg/mL (0,024 μmol L^{-1}) já os melhores resultados foram para o (SNL+2-chalc) com valores de CIM de 0,0153 μg/mL(0,068 μmol L^{-1}) e 0,0305 μg/mL (0,14 μmol L^{-1}) para o SNL+dodecila respectivamente, obtendo valores de IS (índice de Seletividade) que é a relação IS = IC_{50}/CIM. os valores foram (2183 e 1095,1) respectivamente, já para o controle SNL+anfotericina B o valor dos CIMs variam para as três linhagens 0,06 μg/mL (0,064 μmol L^{-1}) a 0,0076 μg/mL (0,008 μmol L^{-1}) seus IS variam de 67,8 a 534,21. Estes dados são observados nas tabelas 10-12, mostrando que as CIMs das substâncias incorporadas foram potencializadas, com altos índices de seletividade maiores ao do controle. Nas tabelas 13 e 14 mostram o quadro comparativo do valor das CIMs das substâncias e delas incorporadas no sistema nanoestruturado lipídico, todos os dados são expressos em triplicata.

Substância Incorporada no Sistema nanoestruturado Lipídico	***P. brasiliensis* (isolado 18, Pb18) *CIM (μg/mL) (μmol L^{-1})**	**CI_{50} (μg/mL)/**	**IS (CI_{50}/CIM)**
SNL+2- chalc	0,0153 (0,068)	33,4	2183
SNL+2' – chalc	0,06 (0,27)	8,5	141,7
SNL+decila	0,0305 (0,10)	8,2	268,9
SNL+dodecila	0,0305 (0,09)	17,7	580,3
SNL+anfotericina B	0,0153 (0,016)	4,06	133

Tabela 10. Determinação da CIM das chalconas e protocatecuatos incorporadas no sistema naoestruturado lipídico, para o Isolado Pb18, concentração inibitória mínima (CIM) estão expressas em μg/mL e μM; resultados expressos em triplicata e independentes.

Substância Incorporada no Sistema nanoestruturado Lipídico	*P. brasiliensis (*isolado 02, Pb02) CIM (µg/mL)/ (µmol L^{-1})	CI_{50} (µg/mL)/	IS (CI_{50}/CIM)
SNL+2- chalc	0,0305 (0,14)	33,4	1095,1
SNL+2' – chalc	0,0076 (0,034)	8,5	1118,4
SNL+decila	0,0076 (0,024)	8,2	1078,9
SNL+dodecila	0,06 (0,19)	17,7	295
SNL+anfotericina B	0,0076 (0,008)	4,06	534,21

Tabela 11. Determinação da CIM das chalconas e protocatecuatos incorporadas no sistema naoestruturado Lipídico, para o Isolado Pb02, concentração inibitória mínima (CIM) estão expressas em µg/mL e µM; resultados expressos em triplicata e independentes.

Substância Incorporada no Sistema nanoestruturado Lipídico	*Paracoccidioides lutzii* isolado 01, Pb 01 CIM (µg/mL)/ (µmol L^{-1})	CI_{50} (µg/mL)/	IS (CI_{50}/CIM)
SNL+2- chalc	0,0305 (0,14)	33,4	1095,1
SNL+2' –chalc	0,015 (0,07)	8,5	566,7
SNL+Decila	0,015 (0,05)	8,2	546,7
SNL+Dodecila	0,0305 (0,09)	17,7	580,3
SNL+anfotericina B	0,06 (0,064)	4,06	67,8

Tabela 12. Determinação da CIM das chalconas e protocatecuatos incorporadas no sistema naoestruturado Lipídico, para o Isolado Pb01, concentração inibitória mínima (CIM) estão expressas em µg/mL e µM; resultados expressos em triplicata independentes.

4.3.5. Análise confirmatoria do teste de sensibilidade para Pb18

Para a confirmação dos efeitos da anfotericina B incorporada no sistema naoestruturado lipídico (SNL + anfotericina B), para SNL+ 2-hidroxichalcona (SNL+ 2-chalc) e para o protocatecuato de dodecila (SNL+dodecila), sobre as células fúngicas de *P. brasiliensis* (Pb18), foram realizadas ensaios no *IN Cell Analyzer* 2000 (GE *Healthcare*) de cada poço da placa de microdiluição com as diferentes concentrações dos fármacos.

A figura 27 apresenta as imagens das células fúngicas do isolado Pb18 frente SNL+ anfotericina B com um CIM de 0,0153 μg/mL, para SNL+2-chalc 0,0153 μg/mL e para o SNL+ dodecila com um CIM de 0,0305 μg/mL respectivamente. Controle negativo (C-), sem crescimento de células fúngicas e controle positivo (C+) com crescimento das mesmas. Os ensaios foram realizados em triplicata e experimentos independentes.

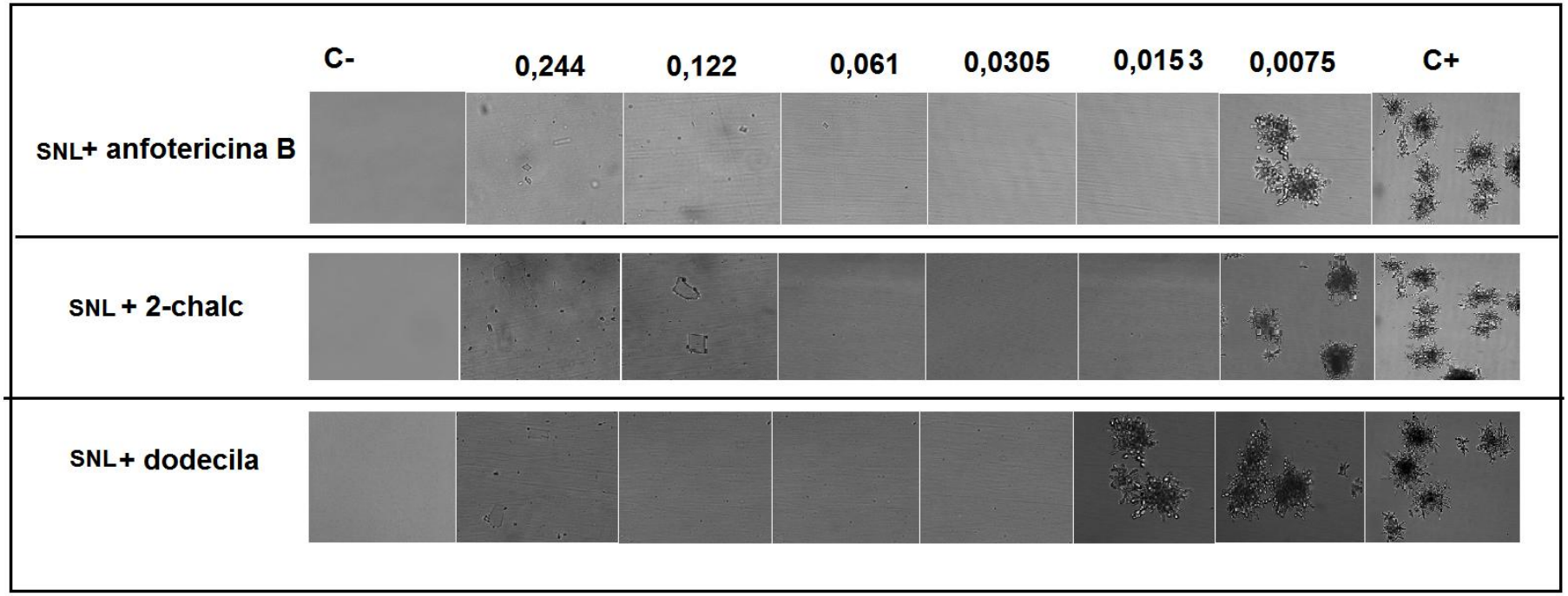


Figura 27. Análise confirmatória da inibição da CIM através do (*In Cell Analyser GE*) com aumento de 20 vezes, para Pb18 com SNL+anfotericina B como controle de tratamento, e com as substâncias incorporadas no nanocarreador SNL+2-chalc e SNL+dodecila, respectivamente.

	2-chalc µg/mL (µmol L^{-1})	SNL+2chalc µg/mL	X aumento	Dodecila µg/mL	SNL+dodecila µg/mL	X aumento	2´chalc µg/mL	SNL+ 2´chalc µg/mL	X aumento	decila µg/mL	SNL+ decila µg/mL	X aumento	anfotericina B µg/mL	SNL+anfotericina B µg/mL	X aumento
P.brasiliensis **(Pb18)**	0,97 (4,3)	0,0153 (0,068)	65	0,48 (1,5)	0,0305 (0,09)	16	0,48 (2,1)	0,06 (0,27)	8	0,97 (3,3)	0,0305 (0,10)	32	0,125 (0,14)	0,0153 (0,016)	8
P.lutzii **(Pb 01)**	0,97 (4,3)	0,031 (0,14)	31	0,48 (1,5)	0,0305 (0,09)	16	31,25 (139,5)	0,015 (0,07	2083	1,9 (6,4)	0,015 (0,05	127	0,125 (0,14)	0,0076 (0,008)	16
P.brasiliensis**, (Pb02)**	0,12 (0,53)	0,0305 (0,14)	4	0,24 (0,7)	0,06 (0,19)	4	0,24 (0,7)	0,0076 (0,034)	32	0,48 (1,6)	0,0076 (0,024)	63	0,06 (0,064)	0,06 (0,064)	---

Tabela 13. Tabela comparativa da determinação da CIM das moléculas derivadas de chalconas e protocatecuatos e das mesmas incorporadas no sistema nanoestruturado lipídico, para os três Isolados, mostrando o aumento da atividade. 2-hidroxichalcona (2-chalc), 2'-hidroxichalcona, sistema nanoestruturado lipídico (SNL), SNL+2-chalc (2-hidroxichalcona incorporado no sistema nanoestruturado), SNL+2'-chalc (2'-hidroxichalcona incorporado no sistema nanoestruturado); protocatecuato de dodecila (dodecila); protocatecuato decila (decila), SNL+ dodecila,(dodecila incorporado no sistema nanoestruturado), SNL+ decila (decila incorporado no sistema nanoestruturado).

	IS 2chalc	IS SNL+2 chalc	X aumento	IS Dodecila	IS SNL+dodecila	X aumento	IS 2´chalc	IS SNL+ 2´chalc	X aumento	IS decila	IS SNL+ decila	X aumento	IS anfotericina B	IS SNL+anfotericina B µg/mL	X aumento
***P.brasiliensis* (Pb18)**	63,4	2183	34	37,3	580,3	16	139	141,7	1	16,5	268,9	16	1,8	133	74
***P.lutzii* (Pb 01)**	63,4	1095	17	37,3	580,3	16	2,1	566,7	270	8,4	546,7	65	3,7	534,21	144
***P.brasiliensis*, (Pb02)**	513	1095	2	74,7	295	4	139	1118,4	8	33,3	1078	32	1,8	67,8	38

Tabela 14. Tabela comparativa do IS (índice de seletividade) das moléculas derivadas de chalconas e protocatecuatos e das mesmas incorporadas no sistema nanoestruturado, para os três Isolado, mostrando o aumento do IS. 2-hidroxichalcona (2-chalc), 2'-hidroxichalcona, sistema nanoestruturado (SN), lipídico (SNL), SNL+2-chalc (2-hidroxichalcona incorporado no sistema nanoestruturado), SNL+2'-chalc (2'-hidroxichalcona incorporado no sistema nanoestruturado); protocatecuato de dodecila (dodecila); protocatecuato decila (decila), SNL+ dodecila,(dodecila incorporado no sistema nanoestruturado), SNL+ decila (decila incorporado no sistema nanoestruturado)..

4.6. Teste de citoxicidade das chalconas e protocatecuatos incorporadas no sistema nanoestruturado lipídico.

Os ensaios para avaliação do potencial citotóxico do sistema Nanoestruturado e das substâncias incorporadas no sistema (2'-hidroxichalcona (2'chalc), 2-hidroxichalcona (2-chalc), protocatecuato decila (decila) e protocatecuato de dodecila (dode) foi realizado o método de sulforodamida B a 0,1% frente a linhagem celular MRC5 (pneumócitos humanos), e HaCaT (queratinócitos humanos).

Os resultados para os dois lotes do sistema nanoestruturado SNL(Dil LT1 e 2) frente a linhagem HaCaT foram 96 e 97% para os dois lotes respectivamente e para o tenso Ativo(TA), componente do sistema, obteve-se um resultado de 92% de viabilidade celular resultados observados na Figura 28.

Os resultados na linhagem MRC5 para o anfoterecina B incorporada no sistema nanoetruturado lipídico (SNL anfo) no seu valor de CIM foi de 98% de viabilidade celular aproximadamente 30% a mais da anfotericna (anfo) observados na Figura 29.

Na mesma linhagem se observou um 91% para o sistema nanoestruturado, para as chalconas e os protocatecuatos incorporadas no sistema se obtiveram resultados de 99 a 100% de viabilidade celular sugerindo que as substâncias são altamente promissoras para o tratamento da *paracoccidioidomicose.* Figura 30.

O controle positivo para as linhagens foram a cumarina com valores de 37% de viabilidade celular por meio da avaliação estatística os valores tiveram diferença significante quando comprados às substâncias com o controle positivo (p<0,01**), os resultados foram realizados em triplicata.

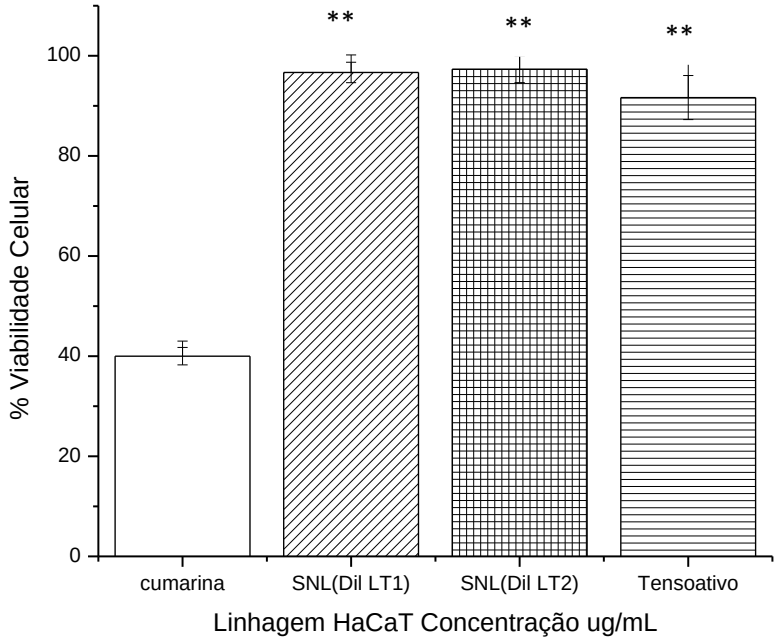


Figura 28. Porcentagem de viabilidade celular frente à linhagem celular de queratinócito, (HaCaT) do SNL (diluentes (DILLT1 e LT2), nos seus valores de CIM foram determinado pelo método de Sulforodamida B, controle positivo cumarina, ($p<0,01$**). Resultados expressos em triplicata.

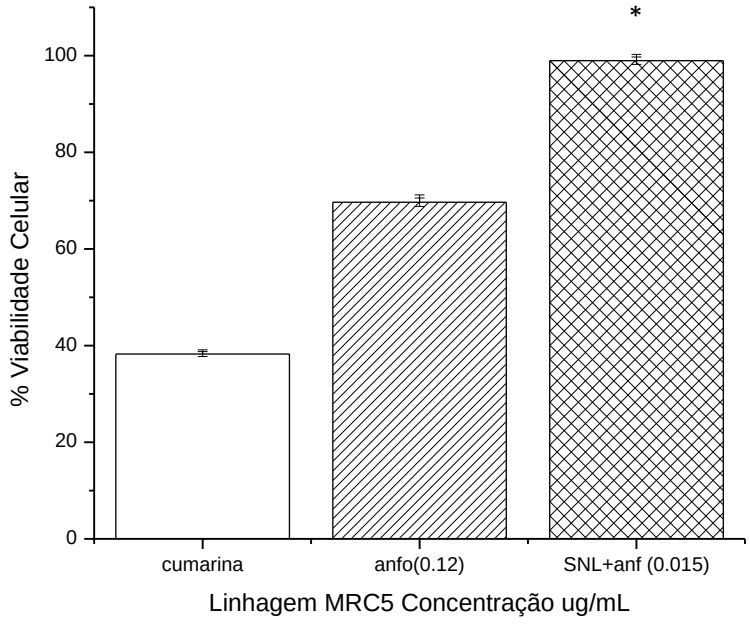


Figura 29. Porcentagem de viabilidade celular frente à linhagem celular de pneumócitos humanos normais (MRC5) da anfoterecina B (anfo) e SNL+ anfoterecina B (SNL +anfo) nos seus valores de CIM foram determinado pelo método de Sulforodamida B, controle positivo cumarina, ($p<0,05$*) resultados expressos em triplicata.

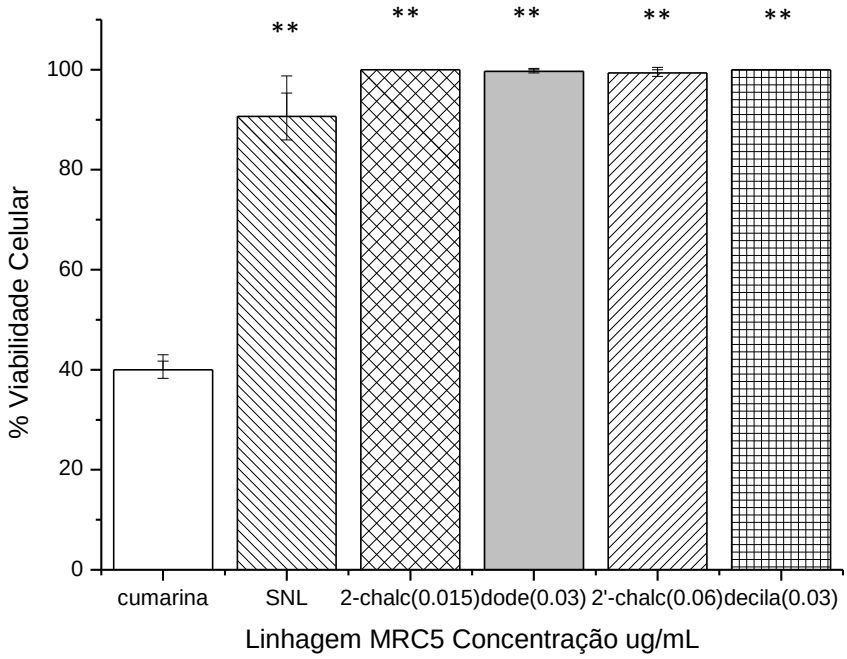


Figura 30. Porcentagem de viabilidade celular frente à linhagem celular de pneumócitos humanos normais (MRC5) do SNL, SNL+ chalconas e SNL+ protocatecuatos nos seus valores de CIM foram determinado pelo método de Sulforodamida B, controle positivo cumarina, (p<0,01**) resultados expressos em triplicata.

4.7. Ensaios para Verificação da Adesão

Foram realizados os ensaios de adesão de *P. brasiliensis (*Pb18) aos componentes da cada matriz extracelular (MEC). As matrizes usadas foram a fibronectina e laminina a uma concentração de 50 μg/mL, estas foram aderidas previamente na placa após o contato overnigth a 8 °C, após se adicionou o fungo e se verificou a adesão do mesmo nas diferentes horas (1^{ra}, 2^{da}, 3^{ra} e 5^{qta}), procedimento descrito na metodologia. Desta forma avaliou-se a capacidade do fungo se aderir na matriz e os resultados foram observados na Figura 31 e 32, observou-se a adesão das células fungicas 10^3 em função do tempo obtendo um melhor tempo de adesão de 3hr para a matriz fibronectina e para a matriz laminina os melhores tempos foram 2 e 3 hr sem diferença significante entre eles. Foi usado como controle positivo o tampão fosfato, os dados foram analisados estatisticamente, apresentando diferença significante quando comparados entre eles (p<0,01**). Os resultados foram realizados em triplicata.

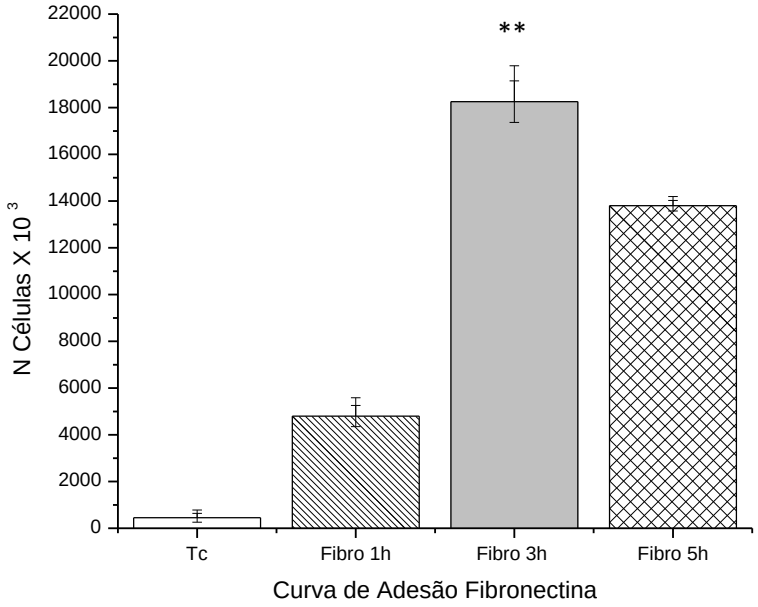


Figura 31. Curva de Adesão da matriz Fibronectina na 1h, 3h e 5h os resultados são expressos em N° de Células X10^3, (p>0,01), os experimentos foram realizados em triplicata.

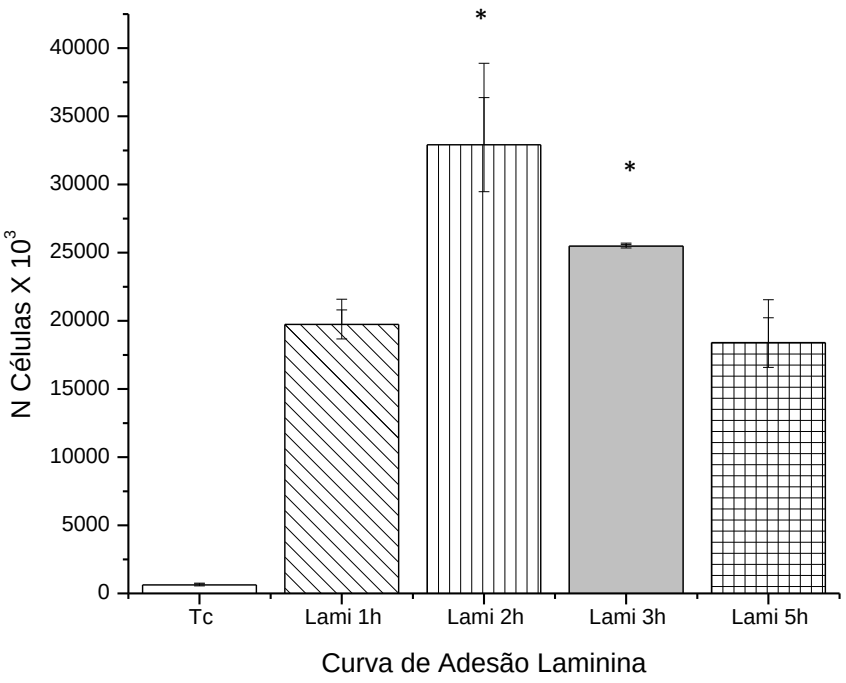


Figura 32. Curva de Adesão da matriz laminina 1h, 2h,3h e 5h. Os resultados são expressos em N° de Células X10^3, (p>0,05), os experimentos foram realizados em triplicata.

4.8. Ensaios para Verificação da Inibição da Adesão

Os ensaios de inibição da adesão de *P. brasiliensis (*Pb18) aos componentes da MEC foram padronizados utilizando concentração de 50 μg/mL de fibronectina e laminina em cada placa, de acordo com o tempo de adesão previamente padronizado realizados anteriormente. Foi estabelecido o tempo de adesão de 3hr para ambas as matrizes após o tratamento por 24hr com as substâncias selecionadas e as mesmas incorporadas no sistema nanoestruturado. Os resultados podem ser observados no valor da CIM na Figura 32 , 2-hidroxichalcona (2-chalc), com 51% e protocatecuato de dodecila (dode) (12) com 64% de inibição da adesão na matriz fibronectina e 2-chalc com 67% e dodecila (12) com 75% de inibição da adesão na matriz laminina.

Para as substancias incorporadas no sistema nanoestruturado lipídico se obtiveram resultados para SNL+2-Chalc com 68,5%, e SNL+dodecila (12) com 81% de inibição da adesão na matriz fibronectina e SNL+2-Chalc com 77% e SNL+dodecila (12) com 82,4% de inibição da adesão na matriz laminina. Figura 33 e 34.

Os dados foram analisados estatisticamente, apresentando diferença significante quando comparados com o controle (p<0,01**), para ambos os gráficos e entre as substâncias (p<0,05*). Quando incorporados no sistema se verificou uma diferença significante entre 2-Chalc ligada a fibronectina frente à ligada a laminina (p<0,05*), assim como a 2-chalc e dodecila ligadas a laminina com o mesmo valor de (p<0,05*), os resultados foram realizados em triplicata.

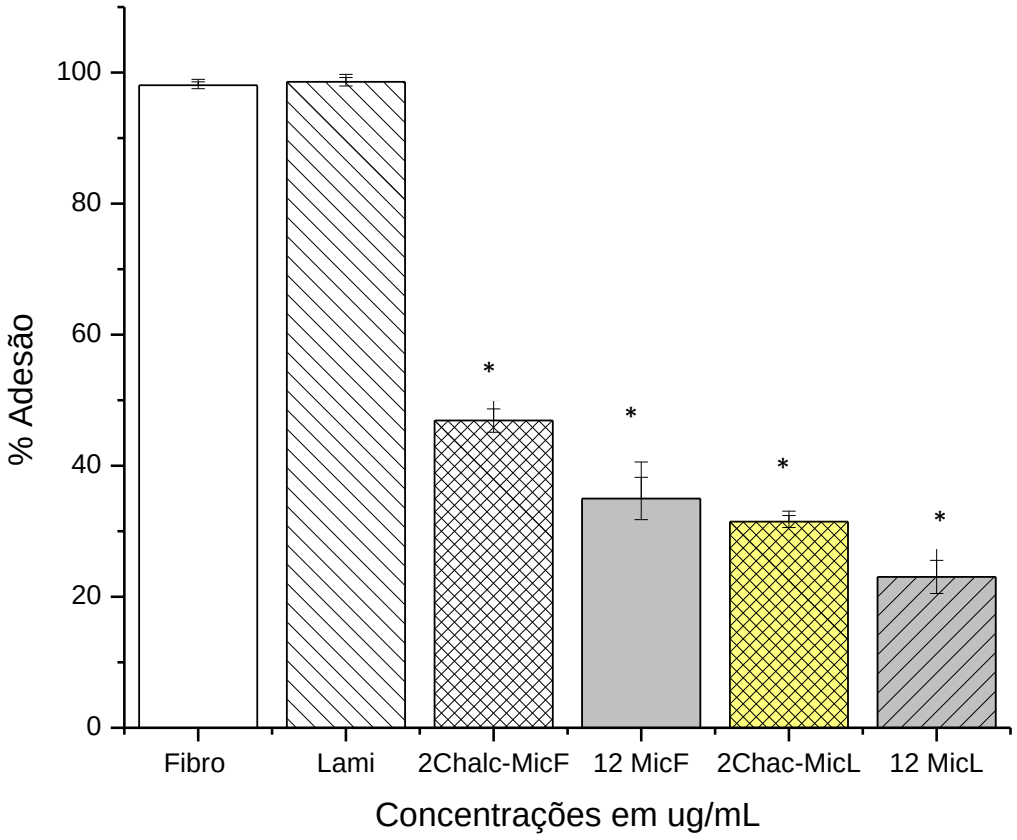


Figura 33. Capacidade Anti-adesiva do *P. brasiliensis* (Pb18) expresso em % da 2--hidroxichalcona (2chmicF) e protocatecuato de dodecila (12MICF) na matriz fibronectina e (2chmicL) e 12-MICL na matriz laminina respectivamente, os resultados foram expressos em triplicata. ($p>0,05$).

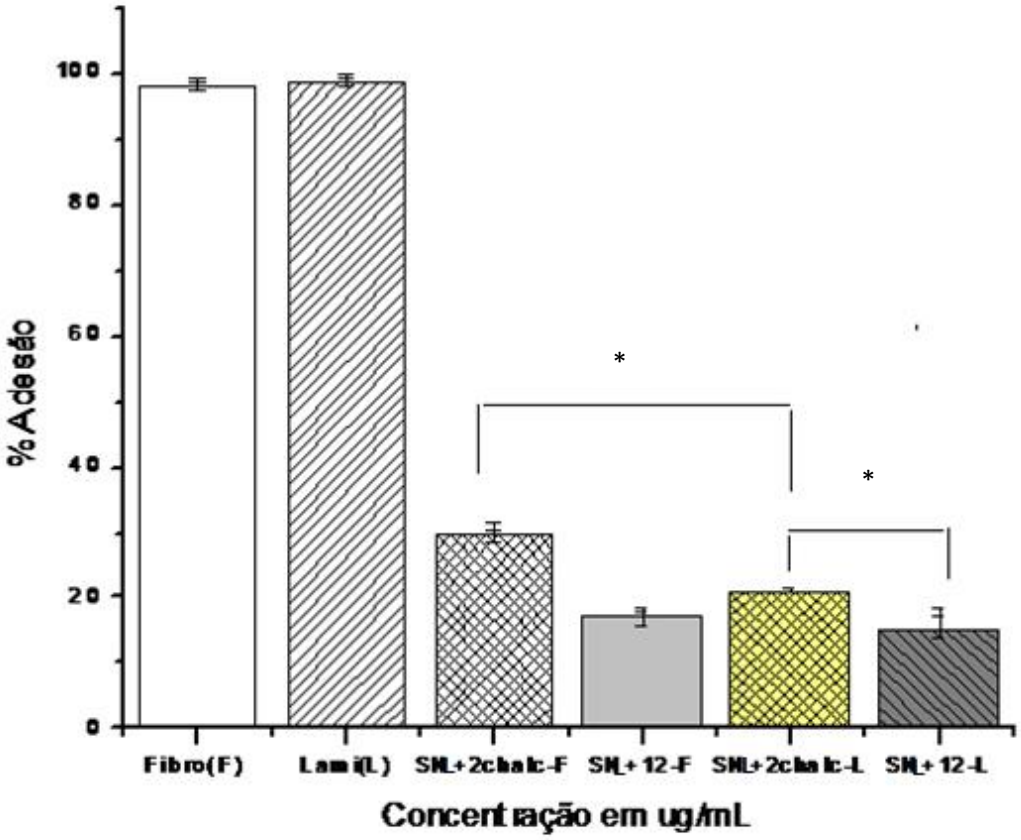


Figura 34. Capacidade Anti-adesiva do *P. brasiliensis* (Pb18) expresso em % da SNL+ 2--hidroxichalcona no valor do CIM na matriz fibronectina (SNL+2chmicF) e protocatecuato de dodecila (SN+12MICF) na matriz fibronectina e SNL+ 2-- hidroxichalcona no valor do CIM na matriz laminina (SNL+2chmicL) e SNL+12-MICL na matriz laminina respectivamente, os resultados foram expressos em triplicata. (p>0,05).

4.9. Determinação das proteínas totais

As proteínas totais presentes na amostra foram determinadas pelo método de Bradford que se baseia na interação entre as moléculas de azul de Coomassie G-250 e os grupos ácidos e básicos das proteínas. Este reagente liga-se, preferencialmente, aos resíduos de aminoácidos básicos e aromáticos. Os resultados da concentração de proteínas totais presente nas amostras de *P. brasiliensis* Pb 18 em duas condições tratada com a 2-hidroxichalcona e a mesma incorporada no sistema nanoestruturado lipídico, estes dados estão descritos na Tabela 15.

Microrganismo	Condição	Densidade óptica (595 nm)	Concentração de proteínas (µg/mL)
***P.brasiliensis* (Pb 18)**	Tratado com 2-chalc	1,350	3960
	Tratado com SNL+2- chalc	0,582	1770

Tabela 15. Concentração de proteínas totais da cepa *P. brasiliensis* Pb 18 sob condições tratada com a substancia sintética 2-hidroxichalcona (2-chalc) e a mesma incorporada no sistema nanoestruturado a quantificação foi realizado pelo método de Bradford.

4.9.1. Análise proteica por eletroforese bidimensional (2D-PAGE)

Para a padronização da análise do perfil proteômico de *P. brasiliensis* Pb 18 a eletroforese bidimensional foi realizada inicialmente com a separação dos pontos isoelétricos das proteínas através de fita de 13 cm, pH não linear variando de 3 a 10, até que fosse obtido um gel com alta resolução dos *spots*. Neste caso, foi evidenciado melhor separação de proteínas na faixa de pH entre 3,0 e 6,0 (Figura 35 A, B, C e 36). Dessa forma o ensaio definitivo foi realizado aplicando-se 600 µg de proteínas foram aplicados em uma fita não linear de 13 cm com pH variando de 3 a 10, que resultou em um gel com boa resolução dos *spots*, sendo este utilizado para a análise proteômica, de um total 320 spots em média para cada situação: controle (apenas o fungo), fungo tratado com a 2-hidroxichalcona e com a mesma incorporada no nanocarreador.

Os géis foram escaniados e as imagens foram analisadas e comparadas pelo software Image Master Platinum (GE) onde as proteínas (spots) foram selecionadas a partir da expressão diferencial detectada pelo programa nas diferentes situações. Assim foram selecionados 240 spots diferencialmente expressos foram excizados dos géis para posterior preparo para o seqüenciamento.

A tabela 16 mostra uma seleção de 10 spots, os quais sugere que proteínas (adesinas) estariao presentes e são de interesse para nosso trabalho, assim como também mostra modificação na expressão das mesmas isto baseado na literatura comparando os pesos moleculares e o *pI* (PARENTE, 2011; PRADO, 2009), do *P.brasiliensis* Pb 18 sob condições tratada com a substancia sintética 2-chalcona e a

mesma incorporada no sistema. Posteriormente faremos os sequenciamento para confirmar nossa hipótese.

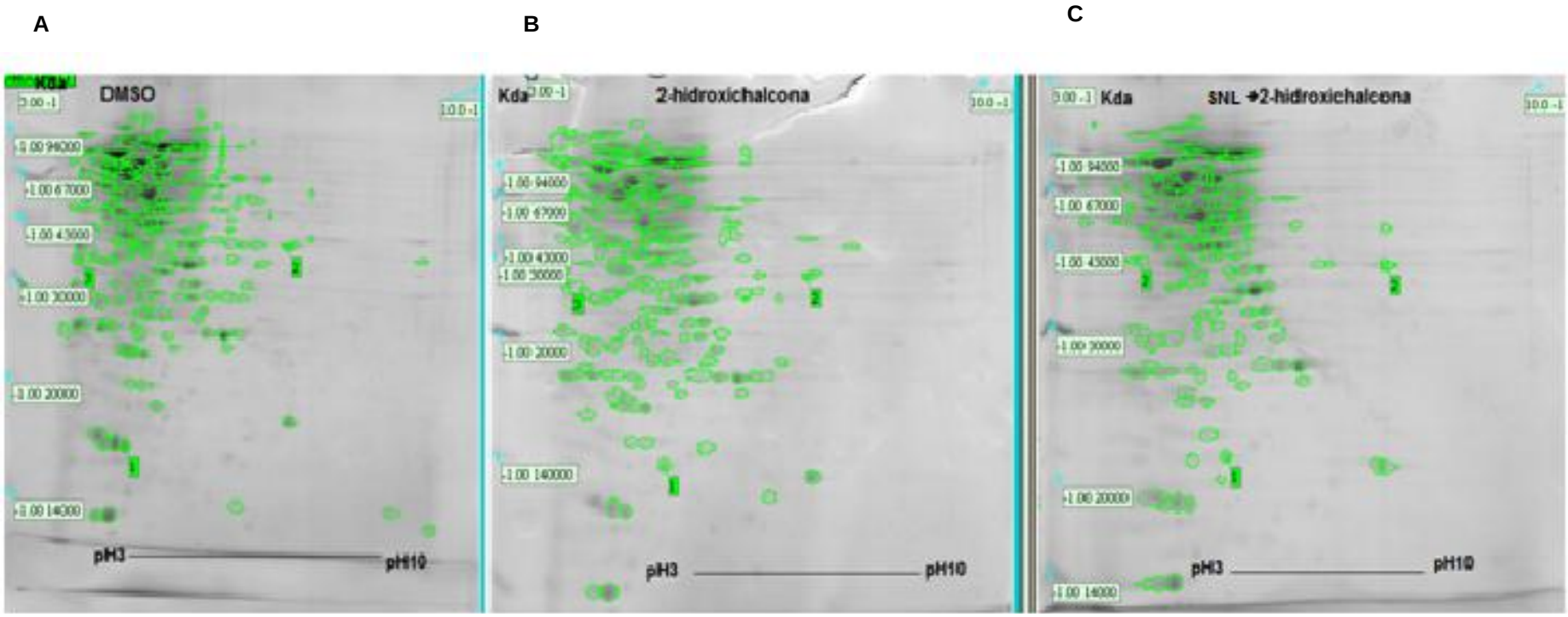


Figura 35. Eletroforese bidimensional dos componentes proteicos totais do isolado *P. brasiliensis* Pb 18 (A) fungo sem tratamento, (B) fungo tratado com a molécula antifúngica 2 hidroxichalcona e a mesma incorporada no sistema (SNL+2hidroxichalcona) **(C).** Os géis foram corados por azul de Coomassie. Padrão de massa molar de 14,0 a 94,0 kDa.

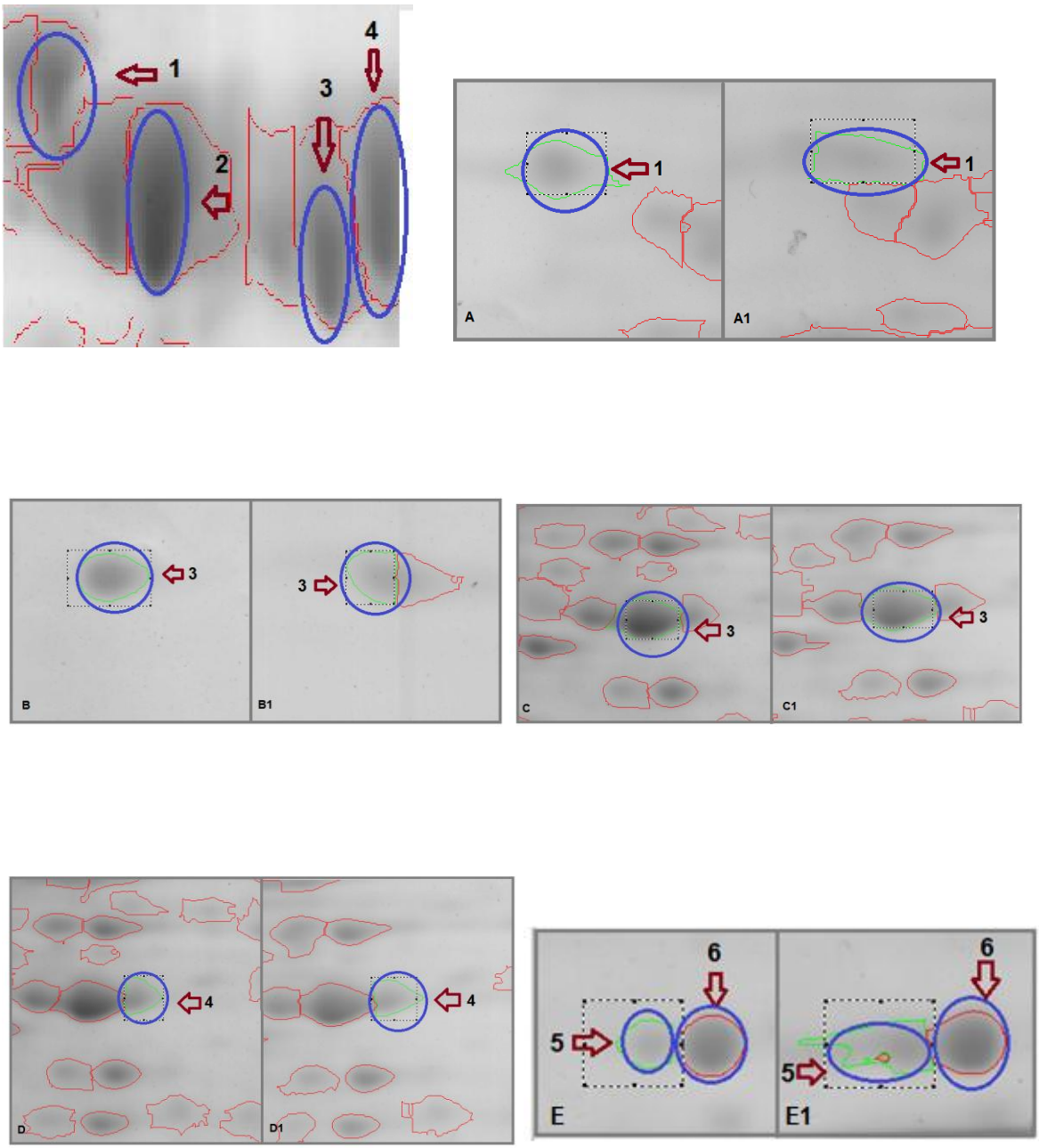
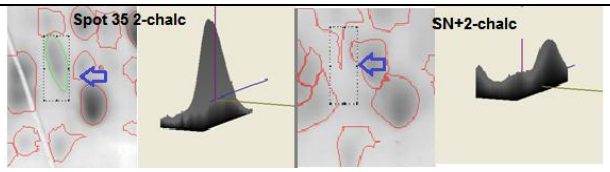
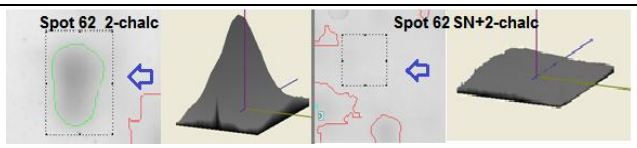
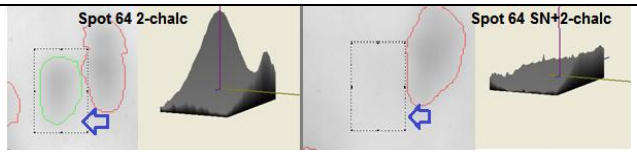
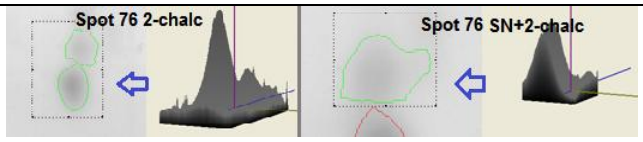
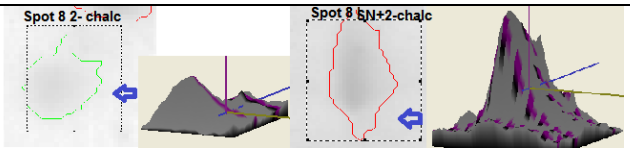
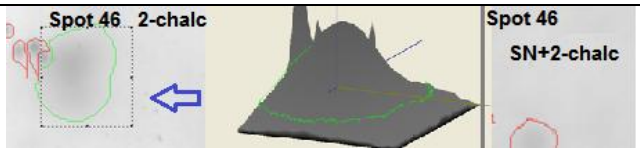
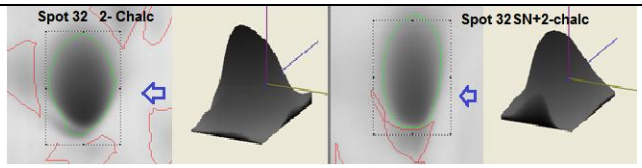
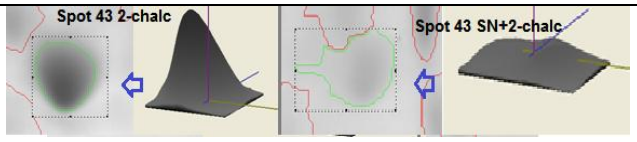


Figura 36. Análise e seleção de alguns spots representativos obtidos por eletroforese bidimensional dos componentes protêicos totais da cepa *P. brasiliensis* Pb 18 em azul os Spots que serão denominados para a sua identificação.

IND	MID	PI	MW	Alteração na expressão
43-kDa Glycoprotein	2070	5,7	43,23	
54-kDa Enolase	2449	5,8	54,63	
30-kDa 14-3-3	2197	4,1	30,72	
32-kDa-Laminina	2203	5,6	30574	
19-kDa Fibronectina e Plasminogenio	2303	6,1	18,095	
80-kDa Proteína de choque térmico 90 - virulencia	1915	**7,08**	80,154	
38.1/43.5 kDa Actina	2129	8,23	38,620	
45.3/43.4 kDa Fosfoglicerato quinase	2041	6,33	45,281	
40 kDa Fructose 1,6-bifosfato aldolase	2105	6,26	40,521	

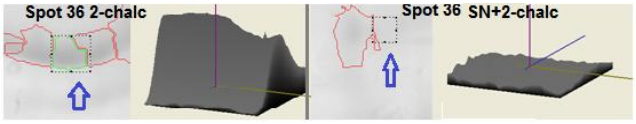
42.4/43.4 kDa mRNA regulador pós-transcripcional de ligação (Csx1) 96	2077	9,15	42,407	

Tabela 16. Seleção de 10 *spots*, baseados na literatura sugerindo que proteínas estariam envolvidas entre os vários mecanismos de ação, baseados no peso molecular (MW) e nos pontos isoelétricos (pI), Imagens *3D* da expressão do *P. brasiliensis* Pb 18 sob condições tratada com a substancia sintética 2- chalcona e a mesma incorporada no sistema nanoestruturado (SNL+2-chalc).

4.9.2. Análise da espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF

As tabelas 17 a 19 apresentam a sequência de proteínas para o *P. brasiliensis* Pb 18 nas condições do fungo sem tratamento, do fungo tratados com 2-chalc e do fungo tratado com SNL+2-chalc, assim como suas respectivas identificações, funções, massa molecular e *pI*. Através de plataforma MALDI-TOF/TOF, foi possível realizar a identificação de 80 proteínas. Estas foram analizadas utilizando os Programas http://www.matrixscience.com/ Mascot MS/MS Ions Search. Com auxílio do programa NBCI/BLAST foi possível identificar e determinar as funções através da busca no banco de dados *SWISS-PROT e* o *Broad Institute.* A tabela 20 mostra um quadro comparativo das proteínas sequenciadas do fungo tratado com 2-hidroxichalcona e SNL+ 2-chalc.

As proteínas encontradas foram principalmente relacionadas ao metabolismo, produção de energia e ciclo celular, citoesqueleto e de adesão indireta. Os números de proteínas identificadas bem como a categorização funcional destas estão expressos na. figura 37.

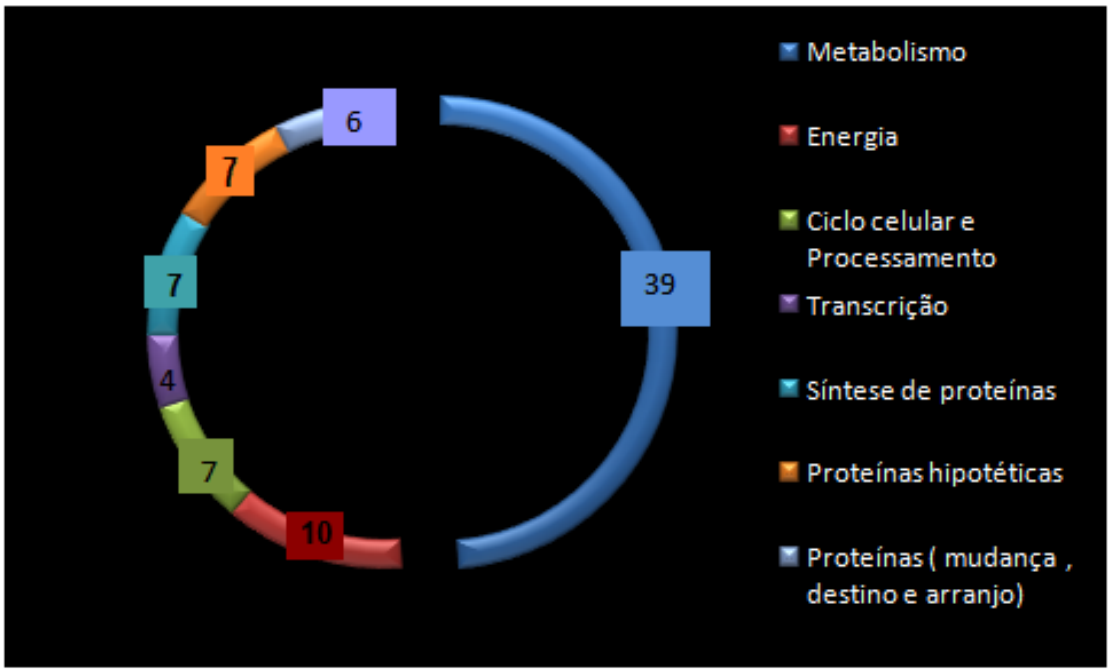


Figura 37. Distribuição das proteínas identificadas e categorização funcional do isolado *Paracoccidioides brasiliensis* (isolado 18, Pb18), seqüenciadas por MALDI-TOF/TOF e analizadas nos bancos de dados.

Spot	*Código de Acesso*	*Proteína*	*Função Atividade*	*Mascot Score*	*Porcentagem de Cobertura(%)*	*MW (Kda)*	*pI*	*Sequencia Correspondida*
1	EEH47392	Mis12-Mtw1 family protein		1296	100	70510	9.80	.MPNGNATK GNDGYAGEGVNGWSGK HIESEGLSEPRR SGDESAR ELEEQINKLQIER
2	EEH49800	eukaryotic peptide chain release factor subunit 1		975	100	52768	6.40	MSAVQANDAEK LSVLSAITSTQQR AQEASRELFMDK
3	EEH47855	hypothetical protein PADG_03939		750		8364	9.62	.AKINLDQIQVPLDSDTK LDDRNHVVCTVSRPSK
4	EEH46733	methionine aminopeptidase 2B		750	100	38372	8.81	RLLHGSPEGEDEDGEDEDND K LLHGSPEGEDEDGEDEDNDK
5	EEH43878	pre-mRNA-splicing factor cwc26	Envolvido em splicing de pré-mRNA	731	100	39580	6.45	.QLESLAMKK IINVAMKRAEAR .GNGFEQQWFEAR
6	EEH44630	crossover junction endonuclease mus81	Endonuclease	471	92	63301	8.97	DIFLKMLMCTR MLMCTRGVTADKALEIQR IAEIWGVNENSKSK
7	EEH44178	serine/threonine protein kinase	Atividade catalítica		100	103629	7.12	AHVNDNLGDSQGK
8	EEH45768	GTP-binding protein	GTPase necessária para subunidade 60S do ribossoma	147	62	59794	6.07	LNKGSSTACPVGAEAGVTTSL R
9	EEH44079	mitochondrial import inner membrane translocase subunit tim16	Componente essencial do complexo PAM			15582	9.80	IEMEVREAGR .KAAMEKEIK
10	EEH43837	gamma-butyrobetaine dioxygenase	Atividade Catalítica	1058	100	58153	8.90	VASTYGFWTALR NNNQHYEYSHR IISEQFPEISTKR
11	EEH48615	CBP4 domain-containing protein	Essencial para a montagem da reductase ubiquinol	40	25	13521	9.41	QQDFDDFVMRLK LKSYAKSDK DEAERQKEQIR

			Citocromo					
12	EEH44225	60S ribosomal protein L16				23211	10.57	GMIPHKSSRGAAAMERLK
13	EEH49796	centromere/microtubule-binding protein CBF5				54976	9.29	RHNGETAEERAER.
14	EEH50283	predicted protein		125	100	65867	9.58	RYGTIVMNER LVGELVSRIR RAFNRPR ESKQGSGNNTNK
15	EEH46571	electron transfer flavoprotein subunit beta	Sub unidade específica flavoproteína de transferência eletrônica	267	96	28444	9.25	AKLPMVITTDLR. .LNTPRYASLPNIMK
16	EEH45302	yippee family protein		231	100	13134	8.97	.MGLTYNIYLSSNK QCKETVGWKYDK
17	EEH42678	cyclopentanol dehydrogenase	Atividade Catalítica	427	100	22650	5.26	IMDPSKCLHIK. VNSISPEHIVNPMVEK
18	EEH44000	predicted protein				14706	9.85	.AAASRLSDTESIK QMNSDNEMQEAKK
19	EEH49800	mitochondrial large ribosomal subunit		756	100	41877	10.82	RDHTAK LPHTSLTVVLKEEK
20	EEH46285	protein kinase gsk3	Atividade Metabólica			45977	7.64	MKTTMPMLEVK DPNTRLPDSR .DEMMAHLD
21	EEH48781	predicted protein				38770	8.94	GNPSLQLGTIVK ILPFLERLSR .ES MLVFHVLLIQSVQR GHPCCGNDELDR
22	EEH44546	AP-2 complex subunit sigma	Componente dos complexos de adaptadores que se ligam a claritrina a receptores em vesículas revestidas.	62	15	17197	5.44	LSTKIVYRR IVYRR QVVLTRLEHLDK LEHLDK LEHLDKLE
23	EEH49981	phosphoserine	Atividade Catalítica	218	56	52211;	6.94	ESGIVHSLFNESPVSLPANSPK

		phosphatase						EVSEITARAMSGQLDFAESLR
24	C1GLM4	methionine aminopeptidase 2B	Atividade Metabólica			38372	8.81	.RLLHGSPEGEDEDGEDEDNDK LLHGSPEGEDEDGEDEDNDK
25	EEH43028	PP-loop ATPase superfamily protein				45033	8.69	DSTVLASVLKTLNER GYRDDSLETVK .GNCTYCGVFR SKPLKYAYEK
26	EEH46571	electron transfer flavoprotein subunit beta	flavoproteína transferência eletrônica serve como um receptor de elétrons específico para várias desidrogenases	523	100	28444	9.25	AKLPMVITTDLR LNTPRYASLPNIMK.
27	EEH48932	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Atividade Catalítica	680	100	35542	6.76	.HNTRGMLSMASK .VLAAGEGEPGGVVLER
28	EEH45262	Uncharacterized protein C1494.08c		132	70	40435	8.46	YLLQDSKINSTLK .SRDAGDMQDMYR DAGDMQDMYRR
28	P04839	cytochrome b-245 heavychain subunit beta	É o componente terminal de uma cadeia respiratória que transfere electrões individuais	285	96	63679	9.06	GAGLVLSIDGALILLPMCR NIWHLR RVEFIWVCK TDVGVYFCGPNPAAK

Tabela 17. Proteínas diferencialmente expressas pela cepa, *Paracoccidioides brasiliensis (*isolado 18, Pb18) separadas com um gradiente de pH 3-10 por eletroforese bidimensional e analisadas por espectrometria de massas MALDI TOF TOF.

Spot	***Código de Acesso***	***Proteína***	***Função Atividade***	***Mascot Score***	***Porcentagem de Cobertura(%)***	***MW (Kda)***	***pI***	***Sequencia Correspondida***
1	EEH43556	phosphatidylinositol-phosphatidylcholine transfer protein	papel direto no controle da formação septação celular e membrana	737	100	40630	5.40	.LDTLSLLRFLR EWAREPK. EVKEVEEVEASTAEK
2	EEH48989	conserved hypothetical protein		95,5	100	51258	9.35	TNERIAR IAYDASLTKMQK RPGRNR
3	EEH50595	phosphatidylserine decarboxylase proenzyme	Pode estar envolvido na regulação do fofolipidio de sintese e o tráfico inter organela de fosfatidilserina	1123	100	61447	9.05	M.LVGRAFVYR. K.GQTAWYMPKPTSNR. K.RGEIYSGFSEATYR
4	EEH48989	conserved hypothetical protein		95,5	100	51258	9.35	TNERIAR IAYDASLTKMQK RPGRNR
5	EEH46570	NADPH-dependent FMN/FAD containing oxidoreductase	Transferências de elétrons do NADPH para o aglomerado Fe-S de dre2.			75361	8.64	YLAALQPGSSLKVHVQK VLDLTVITAFSRDQR EMAEKYLMNMEK KYKQETW
6	EEH49812	conserved hypothetical protein				20505	7.77	LAEVQAILGDDIEVQHR .WFLEALGHDGLNK GPTNFGWDPVFEYQGK
7	EEH47690	taurine catabolism dioxygenase TauD		728	100	45083	6.37	LSSFLAELREDIINGR GFPVEQWGNHK .GETSIGQEEYIR
8	EEH46200	IQ calmodulin-binding motif domain-containing protein				114553	9.04	.FLAEITA AGGAVDDYQQGIRHNQI LLLAR. KCEEEVR

								IMALDFSDIKPER
9	EEH45209	dihydroorotate dehydrogenase	Atividade catalítica			57577;	9.15	MALSNNGR ASAHRWFVPRLIR FNSSSTSSVSASIAEAVK .DYIYCVNRLGK.
10	EEH49318	interferon-stimulated gene 20 kDa protein	Atividade metabólico			36405	9.88	.VSIVNYNGEQVYDSFVRP K NDLKALLLSHPNR ILALELLGLDIQGAAHSSVE DAR
11	Q568K5	Full=N-alpha-acetyltransferase 40	Responsável pela acetilação do N-terminal resíduos de histonas H4 e H2A	75.5	50	32577	7.70	LTSSEMYKNSAGGWSPK LGYGRDEFSPKPMK NGNTREYDYMIFSK
13	EEH45703	mitochondrial inner membrane translocase subunit TIM44 [	Componente essencial do complexo PAM	1102	100	59916	9.43	MFIATKSTPSGVVR RARAAYEAASGAATSK MEEDPNAGTNVTLHKDA AWK ILDIRHVDISHAR
14	EEH46210	guanylate kinase	Atividade metabólica	410	100	22478	7.79	R.EWVVDGGR .EWVVDGGRFGDGD
15	P17558	37S ribosomal protein PET123, mitochondrial	subunidade, e localização subcelular.			33527	9.86	.LQPGDPQFDYVEWK .LMQPSTIQVMKPSK .MPILPDPNVEQR
16	EEH42510	ubiquitin-protein ligase molybdopterin-converting factor				44582	8.00	GDYDDDLILEQLAR EKMYDSILGGLQGMEER AVEDLYDEKVIR
17	EEH49635	cell division control protein	Septinas são GTPases envolvidas em que citocinas no início do ciclo celular	799	100	44582	8.80	QVDKTVEIEITK .AELEEK LDNPKFK
18	EEH46096	adenosine kinase	Atividade metabólica			38527	5.68	.HMGLYEDLIQNHGAR SLCTHLAASNEYK LDHLKQPHIWSLVEK
19	A6RC73	Nucleolar protein 16	Envolvidos na biogênese da	357	97	27995;	10.08	QQSKGEEEWLER LVANHGDNIGAMVR

			subunidade ribossômica 60S					RLNPMQQTEGDIK
20	EEH44566	acetyltransferase	Componente catalítico do terminal n- NATC Acetiltransferase			26545	5.56	DEGTVFLVCKDGGTPVAISR VHEKEFMQLGDFR
21	EEH43648	4hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase	Atividade Metabólica	840	100	45874	5.64	MGFERIAYR.G SIVMASPNERVK EDFEMLK
22	EEH45603	vacuolar protein sorting-associated protein	Podem estar envolvidos na reciclagem de proteínas de membrana entre um compartimento de endocitose e o TGN			357930	5.84	.VDIQDVFLLAAPK .NSPSVNVISAGVRHIR ETLYNLKPKQDK. VSAPIEIQNLLPYDFK FIGMDGIVRPYSQR
23	EEH47323	Cyclin	Componente do complexo SRB8-11. O complexo SRB8-11 é o módulo reagulador do próprio complexo			38140	8.05	AANYWVSTQR QSGASMPPR
24	EEH45844	mitochondrial import receptor subunit tom22	Componente central do complexo receptor mitochondrial responsável para o reconhecimento e translocação de citosolica	318	100	17146	4.47	IAALKDIIPPQSR .ISNSLSSLASFAKSTVSFG GK
25	EEH49262	Fimbrin	Se liga à actina, e funcionalmente associa com actina estruturas envolvidas no desenvolvimento e manutenção celular			71125	5.47	WANEMSHSGGKSSTIRSF K
26	EEH49973 4	uroporphyrinogen-III C-methyltransferase	Atividade catalítica	1071	100	57845;	5.85	.EHYFADSLR. .WIARIFQDDDLK. .WLSQICEYWPLR. .LASITGAEVETILAAYR
27	EEH50595	phosphatidylserine decarboxylase	Pode estar envolvido na regulação da síntese	1123	100	61447	9.05	M.LVGRAFVYR. K.GQTAWYMPKPTSNR.

		proenzyme	fosfolipideos e fosfatidilserina o					K.RGEIYSGFSEATYR
28	EEH43801	kinesin heavy chain isoform 5C		3410	100	184092	6.22	SLICTVEVSYLEIYNER TVAATNMNETSSR.
29	C1GG16	Maintenance of mitochondrial morphology protein 1	conectar o retículo endoplasmático e mitocôndrias	24,6	9	75361	8.64	YLAALQPGSSLKVHVQK VLDLTVITAFSRDQR EMAEKYLMNMEK

Tabela 18. Proteínas diferencialmente expressas pela cepa, *Paracoccidioides brasiliensis (*isolado 18, Pb18) tratada com 2-hidroxichalcona (2-chalc) separadas com um gradiente de pH 3-10 por eletroforese bidimensional e analisadas por espectrometria de massas MALDI TOF TOF.

Spot	***Código de Acesso***	***Proteína***	***Função Atividade***	***Mascot Score***	***Porcentagem de Cobertura (%)***	***MW (Kda)***	***pI***	***Sequencia Correspondida***
1	EEH45237	60S ribosomal prot L7		503	100	58189	10.14	IRLARLAK GINKIAPKPR LLQINNGVFIRLTK
2	EEH43837	gamma-butyrobetaine dioxygenase	Catalisa a síntese de 2-methylcitrate de propionil-CoA e oxaloacetato, e também a partir de acetil-CoA e oxaloacetato com maior eficiência. Também tem citrato sintase	1058	100	58189	8.85	MSLGPLPLHQVRFR MSDIPVGIKAR FEYKNNNQHYEYSHR
3	Q8K1H7	vacuolar amino acid transporter 6	Podem estar envolvidos na reciclagem de proteínas de membrana entre um compartimento de endocitose	86.3	39	60407	9.08	MYIQSRIATAGVK GDTMHERGAINYFK APTTVANVSPNR.
4	EEH46691	3-ketoacyl-CoA	Atividade metabólica	914	100	47916	8.53	HSDAADCMQPMGQTSENVGDDFGITR

		thiolase						YGTTIESLR LGLDHEKVNPR
5	EEH48631	2-methylcitrate synthase	Atividade metabólica	75.5	57	3 51619	9.20	.VNESFHDLLR .FEALMDFASR NSEIAPGVLAEHGKTK
6	EEH45059	enoyl-CoA hydratase	cadeia tioésteres enoil-CoA de C4 até C16 são processados, embora com a diminuição da taxa catalítica	85.1	68	31577	8.87	TAAATLASYVRSSR AIGKSRAMELILTGR VAVVAAKEVVNK
8	EEH45629	glyoxylate reductase	Atividade metabólica	387	87	37159	6.56	SDVISLNLPLNKNTR DGVIIVNTAR SPVPEQAEMSFVS
9	EEH44836	conserved hypothetical protein		32.7	5	195932	6.89	.GRNASHVEK
11	EEH47859	Phosphomannomutase	Atividade metabólica	562	100	30560	5.60	NEFEEFDK GGNDHEIYEDSR TIGHEVTGPDDTMRQLK
12	EEH50726	(R)-benzylsuccinyl-CoA dehydrogenase	Pode funcionar como oxidorredutase (por semelhança).	86.7	96	38475	8.86	FVDEECTPADAVFK QQSVVLVPSDTPGMTIHR GFEIIQGRLGPGR .LGPGRIHHAMR
13	EEH49775	tetratricopeptide repeat protein	Envolvido em promover a absorção de íons potássio			140888	5.28	AFGNRNVMAILGR EKDDTTDTDALVTTISYNLAR DDTTDTDALVTTISYNLAR AGSEEEGGDQDNDVEMK
14	EEH47859	Phosphomannomutase	Envolvida na síntese da GDP-manose e dolicol-fosfato-manose requerida para um número de reações crítica de transferência de manosil	562	100	30560	5.60	NEFEEFDK .GGNDHEIYEDSR TIGHEVTGPDDTMRQLK

15	EEH45631	U1 zinc finger domain-containing protein				35334	6.20	.ESENADHGSFFQVKK DASEEVVPAVVFK
16	EEH45629	glyoxylate reductase	Atividade catalítica	699	100	37159	6.56	SDVISLNLPLNKNTR DGVIIVNTAR SPVPEQAEMSFVS
17	EEH44733	pre-mRNA-splicing factor ini1		32	21	13050	8.47	HHPDLVMCR CPVCDSYVRPTTLVR
18	EEH45155	argininosuccinate lyase	biossíntese amino-ácido; biossíntese de L-arginina; L-arginina a partir de L ornitina e carbamoilo fosfat	36.2	48	52712	5.86	QQHASGAVAGKLWGGR CGRIFGGMAGLMMTIK IFGGMAGLMMTIKGIPSTYNK
19	EEH43258	2,5-diketo-D-gluconic acid reductase A	Atividade metabólica	597	100	32817	6.68	.LNDGNSIPVLGYGTGTAWYK .HFQDAWIQMEK HFQDAWIQMEKLR
20	EEH48236	arrestin	Pode regular a endocitose recrutando RSP5 ubiquitina actividade de se ligar de proteínas da membrana plasmática específicos em resposta a estímulos extracelulares	1182	100	64098	7.71	ALPPSLTGFPGEAEIR GYADIKFLPIEPPR QTDTGVESYAR QQQFSKVSSIPEK
21	EEH49800	mitochondrial large ribosomal subunit	central do complexo receptor mitochondrial responsável para o reconhecimento e translocação de citosolica	756	100	41877	10.82	RDHTAK LPHTSLTVVLKEEK
22	P32468	TRAF-type zinc finger protein		751	100	41477	6.88	MQVHWLMNPR.

Tabela 19. Proteínas diferencialmente expressas cepa, *Paracoccidioides brasiliensis (*isolado 18, Pb18) tratada com o sistema nanoestruturado com a 2-hidroxichalcona (SNL+2-chalc) analisadas por espectrometria de massas MALDI TOF/TOF

	Proteína 2-hidroxichalcona	***Função Atividade***	***MW (Kda)***	***pI***	***Proteína SN+2-hidroxichalcona***	***Função Atividade***	***MW (Kda)***	***pI***
1	phosphatidylinositol-phosphatidylcholine transfer protein	papel direto no controle da formação septação celular e membrana	40630	5.40	60S ribosomal protein L7		58189	10.14
2	conserved hypothetical protein		51258	9.35	gamma-butyrobetaine dioxygenase	Catalisa a síntese de 2-methylcitrate de propionil-CoA e oxaloacetato, e também a partir de acetil-CoA e oxaloacetato com maior eficiência. Também tem citrato sintase	58189	8.85
3	phosphatidylserine decarboxylase proenzyme	Pode estar envolvido na regulação do fofolipidio de sintese e o tráfico inter organela de fosfatidilserina	61447	9.05	vacuolar amino acid transporter 6	Podem estar envolvidos na reciclagem de proteínas de membrana entre um compartimento de endocitose	60407	9.08
4	conserved hypothetical protein		51258	9.35	3-ketoacyl-CoA thiolase	Atividade metabólica	47916	8.53
5	NADPH-dependent FMN/FAD	Transferências de elétrons do NADPH para o aglomerado	75361	8.64	2-methylcitrate synthase	Atividade metabólica	3 51619	9.20

	containing oxidoreductase	Fe-S de dre2.						
6	conserved hypothetical protein		20505	7.77	enoyl-CoA hydratase	cadeia tioésteres enoil-CoA de C4 até C16 são processados, embora com a diminuição da taxa catalítica	31577	8.87
7	taurine catabolism dioxygenase TauD		45083	6.37	glyoxylate reductase		37159	6.56
8	IQ calmodulin-binding motif domain-containing protein		11455	9.04	conserved hypothetical protein		195932	6.89
9	dihydroorotate dehydrogenase	Atividade catalítica	57577;	9.15	Phosphomannomutase	Envolvida na síntese da GDP-manose e dolicol-fosfato-manose requerida para um número de reações crítica de transferência de manosil	30560	5.60
10	interferon-stimulated gene 20 kDa protein	Atividade catalítica	36405	9.88	(R)-benzylsuccinyl-CoA dehydrogenase	Pode funcionar como oxidorredutase (por semelhança).	38475	8.86
11	Full=N-alpha-acetyltransferase 40	Responsável pela acetilação do N-terminal	32577	7.70	tetratricopeptide repeat protein	Envolvido em promover a absorção de íons	140888	5.28

		resíduos de histonas H4 e H2A				potasio		
12	mitochondrial inner membrane translocase subunit TIM44 [	Componente essencial do complexo PAM	59916	9.43	U1 zinc finger domain-containing protein		35334	6.20
13	guanylate kinase	Atividade catalítica	22478	7.79	glyoxylate reductase	Atividade catalítica	37159	6.56
14	37S ribosomal protein PET123, mitochondrial	subunidade, e localização subcelular.	33527	9.86	pre-mRNA-splicing factor ini1		13050	8.47
15	ubiquitin-protein ligase molybdopterin-converting factor		44582	8.00	argininosuccinate lyase	biossíntese amino-ácido; biossíntese de L-arginina; L-arginina a partir d L-ornitina carbamoilo fosfato	52712	5.86
16	cell division control protein	Septinas são GTPases envolvidas em que citocinas no início do ciclo celular	44582	8.80	2,5-diketo-D-gluconic acid reductase A	Atividade metabólica	32817	6.68
17	adenosine kinase	CATALYTIC ACTIVITY	38527	5.68	arrestin	Pode regular a endocitose recrutando RSP5 ubiquitina actividade de se ligar de proteínas da membrana plasmática específicos em resposta a estímulos extracelulares	64098	7.71
18	Nucleolar protein	Envolvidos na	27995;	10.08	mitochondrial large	central do complexo	41877	10.82

	16	biogênese da subunidade ribossômica 60S			ribosomal subunit	receptor mitochondrial responsável para o reconhecimento e translocação de citosolica		
19	acetyltransferase	Catalytic component of the NatC N terminal acetyltransferase	26545	5.56	TRAF-type zinc finger protein		41477	6.88
20	4hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase	Atividade catalítica	45874	5.64	TRAF-type zinc finger protein		41477	6.88
21	vacuolar protein sorting-associated protein	Podem estar envolvidos na reciclagem de proteínas de membrana entre um compartimento de endocitose e o TGN	357930	5.84				
22	Cyclin	Componente do complexo SRB8-11. O complexo SRB8-11 é o módulo reagulador do próprio complexo	38140	8.05				
23	mitochondrial import receptor subunit tom22	Componente central do complexo receptor mitochondrial	17146	4.47				

		responsável para o reconhecimento e translocação de citosolica						
24	Fimbrin	Se liga à actina, e funcionalmente associa com actina estruturas envolvidas no desenvolvimento e manutenção celular	71125	5.47				
25	uroporphyrinogen-III C-methyltransferase	Atividade catalítica	57845;	5.85				
26	phosphatidylserine decarboxylase proenzyme	Pode estar envolvido na regulação da síntese fosfolipideos e fosfatidilserina o	61447	9.05				
27	kinesin heavy chain isoform 5C	Atividade metabólica	184092	6.22				
29	Maintenance of mitochondrial morphology protein 1	conectar o retículo endoplasmático e mitocôndrias	75361	8.64				

Tabela 20. Quadro comparativo das proteínas diferencialmente expressas pela cepa, *Paracoccidioides brasiliensis (*isolado 18, Pb18) tratada com 2-hidroxichaolcona (2-chalc) e o sistema nanoestruturado com a 2-hidroxichalcona (SNL+2-chalc).

5. DISCUSÃO

A razão pela qual escolhemos a paracoccidioidomicose (PCM) para desenvolver um protótipo antifúngico foi devido a que é um problema de saúde publica por sua alta frequência e gravidade dos casos registrados na America latina e principalmente no Brasil com 80% dos casos dos pacientes que foram relatados tiveram as maiores taxas de mortalidade e estas ocorreram no Sudeste do Brasil (PRADO et al., 2009).

Em nossa região (regional de Araraquara envolvendo os 25 municípios), segundo dados não publicados do laboratório de Micologia Clínica que realiza o diagnóstico sorológico de pacientes desta região, são recebidos uma média de 45 solicitações de sorologia a cada 15 dias. Muitos destes são para o gerenciamento terapêutico de pacientes com a doença vigente sob tratamento ou controle de recidivas dos supostamente curados ou que apresentam a cura clínica e que estão sob terapia antifúngica por períodos prolongados, há alguns anos.

A necessidade de um tratamento adequado ainda é um desafio especialmente em pacientes com AIDS. O tratamento estabelecido contra a PCM pode ser utilizado por vários agentes antifúngicos tais como anfotericina B nos casos mais graves ou na forma aguda, azoles (itraconazol) nos casos leves a moderados onde a anfotericina B não pode ser utilizada como dose de ataque e sulfamídicos também mais comuns nas terapias prolongadas. Entretanto, considerando que o itraconazol não está disponível na rede pública da maioria dos estados, a combinação sulfametoxazol-trimetroprim é a alternativa mais utilizada na terapêutica ambulatorial dos pacientes com PCM. Pacientes com formas graves, necessitando internação hospitalar, devem receber anfotericina B ou associação sulfametoxazol/ trimetoprim por via intravenosa segundo o consenso em paracoccidioidomicose. **(**SHIKANAI et al., 2006).

Porém, tanto nos esquemas terapêuticos de doses únicas como nos prolongados existem riscos da toxicidade destes fármacos. Estudos de pacientes que usaram anfotericina B (AmpB) têm demonstrado que ocorrem várias limitações, tais como a sua solubilidade do fármaco na corrente sanguínea, a nefrotoxicidade e mielotoxicidade podendo causar anemia em decorrência de uma alteração na produção de eritropoetina por atuar diretamente na medula óssea (CATALÁN, MONTEJO, 2006).

Um protótipo antifúngico ideal deve ter amplo espectro de atividade antifúngica e nenhuma toxicidade para o hospedeiro (CARRILLO et al., 2006).

Por esta razão, vemos uma nova alternativa em produtos naturais, como as fontes mais produtivas de novas drogas. Várias razões têm sido levantadas para explicar o aumento do número de pesquisas nesta área, entre elas é a sua diversidade química e seus amplos efeitos biológicos (HARVEY, 2008; SARDI et al., 2011).

Com o passar do tempo, produtos naturais estão sendo cada vez mais utilizados na medicina (PARK et al., 1998a). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, plantas medicinais seriam as melhores fontes para obtenção de uma imensa variedade de fármacos (NASCIMENTO, et al., 2011).

Alguns estudos avançam para outras fases do desenvolvimento de protótipos antifúngicos como no trabalho de Johann, et al. (2010), onde *Schinus terebinthifolius* mostrou elevada atividade clinica contra isolados de *P. brasilienses*, demonstrando que há forte potencial de outras plantas que são comumente usadas na terapêutica medicinal brasileira, terem possibilidade de agirem como agentes contra *P. brasilienses* entre elas o ácidos gálicos foram relatados com ação antifúngicas alta contra *P. brasiliensis.*(DE PAULA E SILVA et al., 2013).

Assim, realizamos a prospecção de moléculas derivadas das chalconas que são substâncias classificadas como flavonoides de cadeia aberta (com anel C ausente) e dos protocatecuatos que são derivados de 3,4 - ácido dihidroxibenzóico, um derivado do ácido benzóico encontrado em frutas e vegetais por exemplo, verde-oliva, arroz, chá, vinho branco e ervas, observados nas figuras 01 e 02. (SIMÕES *et al.*, 2006; BRANDÃO 2010; BANDAY *et al.*, 2011; KATSORI et al., 2011; SOARES, 2002).

Estudos mostram a presença de compostos fenólicos que atribuem várias atividades farmacológicas entre estas se destacam a inibição da oxidação de lipídeos e a inibição do crescimento dos fungos, possuem ação antimicrobiana são captadores de radicais livres e podem inibir diversas enzimas essenciais aos fungos tais como a tirosina quinase (MOSTAFA et al., 2013; NGUYEN et al., 2013).

Para a realização da prospecção das chalconas e protocatecuatos foi necessário uma padronização previa da metodologia para determinação da CIM baseada nos documentos normatizados do CLSI para leveduras de isolados do complexo

Paracoccidioides sp. Através da metodologia de microdiluição baseada no documento M27-A2 (DE PAULA E SILVA et al., 2013).

No entanto, foi verificada a dificuldade para a leitura visual da CIM, apesar de na literatura haver relatos desse teste (NAKAI, UNO et al., 2003; JOHANN, CISALPINO et al., 2010; JOHANN, SÁ et al., 2010). Por esta razão foi adaptado o uso do reagente *Alamar blue®,* durante a realização do teste de sensibilidade, o qual funciona como um indicador de viabilidade celular usando o poder redutor de células vivas para medir quantitativamente a proliferação celular. (DE PAULA e SILVA, 2013).

Portanto, foram feitos testes de e microdiluição com Pb18 e Pb 02 e Pb 01. Desta forma não foi necessária a utilização de crescimento por plaqueamento do fungo em meio de cultivo, método tradicional para verificação da CFM, considerando que para este caso, tal teste na maioria das vezes é inconclusivo para o fungo em estudo, pelo longo período de incubação da placa, com a alíquota plaqueada, resultando na desidratação do meio de cultura sólido, e consequentemente à morte de células possivelmente inviáveis, levando a um falso negativo.

Os ensaios de microdiluição para os fármacos anfotericina B e itraconazol como controle (tabela 01) já que são os medicamentos de escolha para o tratamento da PCM, com valores de CIM que variaram de 0,125- 0,06 μg/mL para anfotericina B e de 0,02-0,008 μg/mL para itraconazol. Os valores encontram-se dentro das faixas observadas na literatura.

As chalconas variando de 0,97 a 0,48 μg/mL, para o isolado Pb 18; 0,48 a 0,12 μg/mL para Pb 02 e de 31,25 a 0,97 μg/mL para Pb01 respectivamente. Observou-se que a 2-hidroxichalcona (2-chalc) apresentou o efeito antifúngico mais potente para todos os isolados estudados com um valor máximo de CIM de 0,12 μg/mL para Pb 02. Observados nas tabelas 02-04.

Conjuntamente se realizou-se os ensaios de microdiluição para os protocatecuatos e suas frações (hexila, hepila, octila, nonila, decila e dodecila) e foram muito eficazes contra o complexo *Paracoccidioides*, com valores de CIM que variaram de 7,8 a 0,97 μg/mL para Pb 18 e Pb 01 e de 1,9 a 0,24 μg/mL para Pb02, respectivamente. Verificou-se que o protocatecuato de dodecila (dodecila) apresentou o efeito antifúngico mais potente entre os protocatecuatos para todas os isolados com um valor máximo de CIM de 0,24 μg/mL para Pb 02,. observados nas tabelas 05-07.

Foi possível ainda, observar que os isolados Pb 18 e Pb 02 apresentaram os menores valores de CIM assim com uma ação antifúngica forte para as chalconas e para os protocatecuatos, desta forma é possível inferir que estes isolados apresentaram maior sensibilidade porque possuem características morfológicas muito similares, diferente ao Pb01. Os diferentes valores de CIM obtidos podem ser devido à significativa diferença entre os isolados do complexo, pois estes diferem quanto a características morfológicas e biomoleculares (BAGAGLI, BOSCO et al., 2006; BAGAGLI, THEODORO et al., 2008; CARRERO et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2009), revelando o quão diferente é a influencia dos antifúngicos aos diferentes isolados.

Assim, este estudo também contribuiu para o conhecimento da atividade antifúngica dessas substâncias contra os diferentes isolados do complexo *Paracoccidioides*.

A (Kamala) é um extrato vermelho preparado pela extração *Mallotus philippinensis* (SINGH et al., 2001), é uma nova chalcona dimérica usada na medicina popular contra infecções parasitarias da pele (WEALTH, 1998). Também foram avaliados quanto à atividade antifúngica contra diferentes leveduras patogênicos em humanos e fungos filamentosos como contra o *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus* , mostrou 54% de inibição quando infectadas com o fungo. (KULKARNI et al., 2013).

Em estudo realizado por JOHANN et al., 2010(a), foram encontrados vários ativos contra *P. brasiliensis*, com valores de CIM variando de 7,8 μg/mL a 30 μg/mL a partir da fração hexânica de um extrato hidroalcoólico de *Piper regnelli* e *Baccharis dracunculifolia*. Em outro estudo de JOHANN et al 2010(b), foram encontradas frações subdivididas em quatro compostos, por meio de vários procedimentos cromatográficos, um deles, o composto denominado de esquinol que apresentou CIM de 7,5 a 125 μg/mL para todos os isolados *P. brasiliensis* Pb B339 e Pb 1578 estudados. Além disso, todas essas substâncias foram testadas com agentes antifúngicos comerciais, e o único que se destacou com atividade sinérgica foi o composto esquinol.

Comparando os nossos resultados das chalconas e dos protocatecuatos que apresentaram CIM muito menores e, portanto melhor atividade anti-*Paracoccidioides* com as substâncias citadas em estudos de JOHANN et al (2010 a e b), observamos a grande potencialidade para desenvolvimento de um protótipo antifúngico a partir de moléculas de chalconas e de protocatecuatos.

Nos ensaios que avaliaram a citotoxicidade das moléculas de chalconas e dos protecatecuatos mostrados pela viabilidade das linhagens celulares após contato das moléculas antifúngicas. Para as chalconas os valores variam de 77% a 97% de viabilidade celular para o método de MTT já para o sulforodamida B os valores variaram de 70 a 90% observados nas figuras 09 e 10, a substância 2-hidroxichalcona (2-chalc) foi a que apresentou a maior viabilidade celular com 97% observados na figura . Já para os protocatecuatos a viabilidade celular variou de 70% a 98%, o dodecila apresentou o valor mais alto com 98% de viabilidade celular observados na figura 11 e 12.

Desta forma destacamos a duas substâncias (dodecila e 2-chalc), dodecila que apresentou atividade antifúngica mais potente nos isolados com valores de CIM de 0,48 μg/mL para Pb18 e Pb02 e 0,24 μg/mL para Pb01, com o índice de seletividade de 37,7, e a chalcona mais potente, a 2-chalc com 0,97 μg/mL para Pb18, Pb01 e 0,12 μg/mL para Pb02 com um índice de seletividade de 139 observados nas tabelas 02 a 04. Lembramos que valores maiores que 10 para o índice de seletividade (IS) significam maior especificidade de ligação da molécula em estudo para o fungo. Também observamos que houve um aumento de 30 vezes no valor de IS para a dodecila e 8 vezes e para a chalcona de 38 e 28 vezes quando comparado com a anfotericina e itraconazol que são antifúngico padrões de escolha para o tratamento da PCM que possue um IS de 3,7, e 5,0 respectivamente o que as torna agentes antifúngicos que podem causar toxicidade no paciente, com o uso prolongado, já que o índice recomendado de seletividade > = 10. Estudos tem sido descrito que AmpB também pode causar a morte das células através da indução de uma forte explosão oxidativa, (SANGALLI-LEITE F. *et al.*, 2011).

Os sulfamídicos e azólicos (cetoconazol, fluconazol, itraconazol), pacientes que devem fazer uso de um longo tratamento por mais de dois anos, desta forma aumentam o risco de toxicidade comprometendo assim a terapia (BRUMMER et al., 1993; PANIAGO et al., 2003, TRAVASSOS et al., 2008). Alem de ter sido ineficientes para os tratamentos de longa duração associados a pacientes com AIDS (CORTHAY et al., 1999).

Por esta razão a importância de nosso estudo na falta de tratamentos adequados no mercado. Com uma relevância maior porque nossos estudos mostraram serem excelentes substâncias antifúngicas, sem toxicidade e com altos índices de seletividade

30 vezes maior e mais seguras do que os fármacos anfotericina B e do itraconazol por conseguinte elas podem ser tornar excelentes alternativas de tratamento para a PCM.

As melhores substâncias de nosso trabalho foram a 2-chalc e a dodecila se tornam altamente seguras o que significa que tem um alto efeito antifúngico com quase nenhuma toxicidade e os resultados estão apresentados nas tabelas 02 a 07 e Figuras 08 a 13.

Desta forma estas duas substâncias foram escolhidas por suas elevadas atividades antifúngicas, a não toxicidade celular e por seus elevados índices de seletividade. No entanto, a 2-chalc e a dodecila possuem baixa solubilidade e a 2-chalc possui baixa bioestabilidade o que dificulta a viabilidade dos testes e podem causar problemas na administração do futuro fármaco.

Pelas razões mencionadas foi desenvolvido e incorporado as substâncias escolhidas num sistema nanoestruturado lipídico (SNL) e a fim de aumentar os seus efeitos biológicos, aumentar a solubilidade, a bioestabilidade, facilitar a sua entrega e viabilizar a manipulação farmacotécnica e suas formas de dosagem.

O SNL tem inúmeras vantagens para a incorporação de produtos naturais e semissintéticos, na sua formulação eles ajudam a melhorar a farmacocinética e farmacodinâmica, incluindo a valorização da solubilidade, bioestabilidade, a estabilidade, bem como a proteção contra a toxicidade (MORAES M. C.et al., 2010; XIMENES et al., 2010).

Considerando que a terapia da PCM pode perdurar por anos, dependendo do tipo de paciente e para assegurar casos recidivantes, um sistema carreador seguro se faz necessário. Estes sistemas podem ser aplicáveis no controle da liberação de fármacos, modulando a velocidade com que estes atravessam as barreiras biológicas, penetram à circulação e atingem o alvo farmacológico. O sítio de infecção mais comum do *Paracoccidioides* sp é o pulmão e este não oferece condições para ideal biodisponibilidade para fármacos de baixa solubilidade. Assim, um sistema nanocarreador seria mais eficaz para a entrega destas moléculas ativas podendo atuar como sistemas de vetorização de fármacos, permitindo direcionar o fármaco no organismo evitando seu acúmulo em tecidos não específicos, tornando-o menos tóxico e elevando sua concentração no local em que deve exercer seu efeito farmacológico (OLIVEIRA; SCARPA, 2001; OLIVEIRA et al., 2004).

Os sistemas nanoestruturados lipícos são capazes de compartimentalizar fármacos nas gotículas da fase interna, as quais possuem propriedades físico-químicas

bastante diferentes das do meio dispersante, induzindo modificações nas propriedades biológicas dos fármacos incorporados (BHARGAVA et al., 1987). Além disso, esses sistemas melhoram a solubilização de fármacos lipofílicos em água e os protegem contra hidrólise enzimática, além de aumentar o potencial de absorção devido à presença de tensoativo (FORMARIZ et al., 2005).

Neste contexto, quando ocorre a incorporação de fármacos nas gotículas de LDL rica em colesterol, produzindo um sistema de liberação específica de fármacos, podendo aumentar o efeito desejado, reduzindo a toxicidade potencial do fármaco sobre as células normais (MARANHÃO et al., 1994).

O uso do colesterol como fase oleosa pode modificar profundamente a velocidade de liberação de fármacos, oferecendo benefícios que incluem o aumento da solubilidade e o direcionamento para sítios especificos, diminuindo a toxicidade e aumentando a eficácia clínica de fármacos (AZEVEDO et al., 2005; PRETE et al., 2006; DIAS et al., 2007).

Nanoemulsões antimicrobianas são altamente estáveis com amplo espectro contra vírus, fungos e bactérias (BOIVIN, et al., 2008; HAMOUDA et al, 2000; MYC et al., 2002), O sistema (NB – 002) mostrou atividade contra, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton*, *floccosum*, *e Microsporum spp* e *C. albicans* bem como 12 outros géneros de fungos filamentosos. Com uma atividade antifúngicida contra todos os dermatófitos (ASTICCIOLI et al., 2008; AWADALLA et al., 2008).

Os valores de CIM variaram de 0,06-0,5 μg/mL para *Alternaria spp* e em concentrações de 2 a 8 μg/mL, NB - 002 demonstrou uma atividade antifúngica *in vitro* com amplo espectro de cobertura contra fungos filamentosos e leveduras como, dermatófitos e *C. albicans* (PANNU et al., 2009).

Com base nestes dados reafirmamos a importância dos nanocarreadores na atividade antifúngica e a importância dos mesmos em nossa pesquisa.

Por esta razão construímos um sistema nanoestruturado para incorporar 2-hidroxichalcona (2-chalc) e de protocatecuato de dodecila (dodecila) e viabilizar assim os problemas de baixa solubilidade e bioestabilidade da 2-chalc que estas apresentaram.

O sistema foi desenvolvido com os cuidados toxicológicos de cada componente da formulação. Através da formação de uma fase oleosa (colesterol), uma fase aquosa

(tampão fosfato) e um tenso ativo responsável pela união das fases, formou-se sistema com partículas de tamanho desconhecido e portanto foi realizada a caracterização físico química com partículas de tamanho de 151,22 nm e índice de polidispresão (PDI) 0,16.

Duas substâncias de cada classe foram escolhidas em função aos melhores resultados (chalconas e protecatecuatos) foram selecionadas para a incorporação inicial no sistema. Com a incorporação das moléculas ativas de chalconas inicialmente selecionadas 2-chalc (2-hidroxichalcona) no sistema (SNL+2-chalc) a partícula apresentou o tamanho de 152,55 nm e o PDI de 0,12 e 2'-hidroxichalcona SN+2'-chalc com 145,88 nm e PDI 0,11. Para as moléculas de protecatecuatos incorporadas, as partículas mediram 147,82 nm para dodecila (SNL+12) e o PDI foi 0,13 e para o protocatecuato decila o tamanho das partículas foi de 149,43 nm e PDI 0,13. Para o fármaco controle anfotericina B mediu 156,22 nm e PDI 0,12. Obserados na tabela 08 estes valores foram obtidos pela média dos valores expressos nos ensaios.

Os resultados mostraram que o tamanho das partículas se encontram dentro dos parâmetros estabelecidos para o sistema nano e os valores de índice de polidispersão (PDI) obtidos foram menores que 0,5 os que garantem a homogeneidade do sistema formado (JANES; ALONSO, 2003).

O nosso sistema carreador, após a caracterização físico-química parcialmente realizada pode ser definido como um sistema nanoestruturado lipídico. O conceito de nanoestruturado define como um sistema com tamanho de gotas em escala nanométrica (tipicamente de 20-1000nm) e são muitas vezes referidas na literatura como miniemulsões, microemulsões, nanoemulsões, etc (EL-AASSER et al., 2004).

Também foi realizado o ensaio de potencial zeta para cada substância incorporada e no sistema nanoestruturado lipídico (SNL) sem incorporação onde foi observado os valores de -58,30 mV para o sistema nanoestruturado, para as chalconas com a molécula a 2-hidroxichalcona incorporada no sistema SNL+2-chalc o valor foi -65,31 mV, para 2'-hidroxichalcona SNL+2'-chalc foi -55,47 mV e para os protocatecuatos incorporados neste caso o protocatecuato de dodecila (SNL+12) o valor foi -68,12 mV, protocatecuato decila o valor foi -61,52 mV e para anfotericina B incorporada, como controle, o valor foi -57,63 observados na tabela 09.

Os valores obtidos se encontraram na normalidade já que os valores foram acima de 30 mV, este é um modulo importante para a estabilidade das nanopartículas, uma vez que as forças repulsivas evitam agregações da nanopartícula, desta forma,

padronizamos o sistema nano carreador e as substâncias incorporadas neste (LEGRAND et al., 1999; SCHAFFAZICH et al., 2003).

Para a determinação morfológica do sistema nanoetruturado lipídico e para as substâncias incorporados no mesmo sistema, através do (MEV) observados nas Figuras 19-25, observamos as fotomicrografias com vista panorâmica e nanopartícula isolada as quais apresentaram forma esférica e não modificou quando incorporou-se as chalcona e os protocatecuatos.

Após a caracterização físico-química e mostrou-se todos os resultados estarem dentro dos parâmetros estabelecidos, continuamos com às análises biológicas, foi testado quanto à atividade antifúngica *in vitro* o sistema nanocarreador (SNL) bem como as moléculas antifúngicas incorporadas.

Portanto cada protótipo SNL-2-chalc, SNL + dodecila, SNL+2'-chalc, SNL+decila e o controle com SNL+anfotericina B. Os valores observados de CIM variam de 0,06-0,0076 μg/mL observando assim a potencialização dos efeitos antifúngicos iniciais aumentando de 8 a 16 e a viabilidade celular aumento de 67% para anfoterecina B e de 98% para SNL+anfo e os índices de seletivivdade aumentaram de 38 -144 vezes a mais com o sistema observados nas tabelas 10 a 14 e figura 26 a 29 .

A CIM foi reduzida de 0,97 μg/mL para 0,015 μg/mL para a 2-chalc, de 0,48 μg/mL a 0,0305 μg/mL para dodecila. Desta forma aumentando a atividade antifúngica em 65 e 32 vezes para a 2-chalc e para a dodecila, incorporadas respectivamente, com 99% a 100% de viabilidade celular com um índice de seletividade que melhorou com valores de 63,4 para 2183 para 2-chalc e de 37,3 para 580,3 para dodecila incorporada ao SNL, aumentando em até 34,4 vezes a seletividade da molécula antifúngica 2-chalc para o fungo quando no sistema SNL (Tabela 13 e 14).

Assim, observou-se que o sistema nanoestruturado lipídico pode satisfatoriamente transportar as moléculas antifúngicas (2-chalc e dodecila) e aumentar os efeitos dos mesmos melhorando a bioestabilidade e solubilidade, sem a necessidade de colocar um diluente que poderia causar citotoxicidade e mascarar um efeito que não seria especificamente da molécula antifúngica. É relevante salientar que o sistema possui uma alta eficiência já que conseguiu melhorar o efeito antifúngico, a viabilidade celular e inclusive o índice de seletividade da anfoterecina B, desta forma possivelmente se torna num protótipo antifúngico muito interessante quando incorporado a substância além do o sistema se tornaria num veículo muito eficiente.

A capacidade de isolados do complexo *Paracoccidioides sp* causar infecção e estabelecer a doença, apresentando uma variedade de manifestações clínicas de forma localizada ou disseminada podendo progredir para a letalidade provavelmente depende da relação entre a virulência do fungo e sua capacidade para interagir com estruturas da superfície das células do hospedeiro. A doença pode afetar diretamente os órgãos, então *P. brasiliensis* deve ter desenvolvido mecanismos que lhe permitem aderir, invadir, e ir além das barreiras impostas pelos tecidos do hospedeiro MENDES - GIANNINI et al., 2000).

A adesão é um dos primeiros passos para o estabelecimento da infecção. A interação celular de uma forma ordenada e o seu ambiente extracelular permitem este processo (TROYANOVSKY, 1999). A adesão do agente patogênico leva ao reconhecimento de hidratos de carbono e os ligantes de proteínas, na superfície da célula hospedeira ou proteínas da matriz extracelular (MEC) (PATTI et al., . 1994). O grande número de tipos de tecido que os fungos podem colonizar e infectar sugere que eles usam uma variedade de moléculas de adesão da superfície (SULLIVAN et al., 2004).

Várias proteínas da MEC estão presentes na superfície das células hospedeiras tais como a fibronectina e laminina. Já é conhecido por nosso grupo que estas se constituem como moléculas aceptoras reconhecidas pelo fungo *Paracoccidioides* sp que também expressa proteínas específicas (adesinas) ou ligantes específicos para formar pontes adesivas e participar do estabelecimento do processo de adesão do fungo (MENDES - GIANNINI et al., 2000).

Utilizando a estratégia de impedimento do processo adesivo do fungo às células hospedeiras, foi investigada a atividade anti-adesiva dos protótipos antifúngicos. Para verificar este efeito, ensaios de adesão do fungo foram previamente realizados com as matrizes fibronectina e laminina em placas. Uma curva de adesão do fungo frente ao tempo para o estabelecimento da ligação do maior número das leveduras foi construída e assim o tempo para que a ligação do isolado Pb 18 foi de 3hrs, figura 30 e 31.

Posteriormente foi realizado o tratamento por 24 hrs com os protótipos escolhidos (2-chalc, SNL+2-chalc e dodecila, SNL+dodecila) com objetivo de verificar a atividade inibitória da adesão. Observou-se que nas duas matrizes houve inibição significativa da adesão, com a 2-Chalc inibindo 51% e Dodecila (12) 64% na matriz fibronectina. Para 2-Chalc a atividade inibitória da adesão foi de 67% e Dodecila (12) foi de 75% na matriz laminina. Já para as moléculas antifúngicas incorporadas no

sistema nanoestruturado lipídico obtiveram-se resultados para 2-Chalc com 68,5%, e Dodecila (12) com 81% de inibição da adesão na matriz fibronectina. A atividade inibitórioa da adesão para 2-Chalc foi de 77% e para Dodecila (12) foi 82,4% na matriz laminina, observados na figura 32 e 33, mostrando que efetivamente as moléculas semissintéticas 2-chalc e dodecila produziram significativamente a inibição da adesão, um dos prováveis mecanismos de ação promissores para uma investigação mais detalhada.

A inibição da adesão dos ligantes de laminina e fibronectina destas duas moléculas antifúngicas foi 10 vezes potencializada quando incorporadas no SNL desenvolvido. Estes resultados mostram a magnitude de possibilidades de mecanismos de interrupções de novos ligantes destas duas matrizes ou adesinas do fungo, alvos importantes de *Paracoccidioides* sp ainda desconhecidos.

A presença das substâncias fenólicas tem sido muito estudada por estes apresentarem atividades farmacológicas e também por inibirem a oxidação lipídica e a proliferação de fungos. Os ácidos fenólicos são caracterizados por terem um anel benzênico, uma carboxila e um ou mais hidroxilas e/ou metoxilas na estrutura (SOARES, 2002). Tais características podem atribuir o efeito antifúngico potente observado em nosso trabalho a todos os protocatecuatos, em especial à dodecila.

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

Brandão e colaboradores (2010) relataram em seu estudo a atividade antibacteriana e antiviral das chalconas. Por tal razão o alto efeito antifúngico observado em nosso trabalho as chalconas em especial a 2-hidroxichalcona.

Um nanocarreador permite que o efeito antifúngico da substância atinja o local de ação, incluindo efetivamente a melhora da solubilidade, biodisponibilidade, a estabilidade, bem como a proteção da toxicidade (XIMENES et al., 2010). Há estudos que demonstram que as nanoemulsões possuem atividades antimicrobianas, são altamente estáveis, suas fases oleosas e aquosas em tamanho nanométricos e suas gotículas possivelmente carregam a atividade de amplo espectro contra vírus, fungos e bactérias (BOIVIN et al., 2008; SUTCLIFFE et al., 2008).

O nanocarreador SNL que desenvolvemos e estudamos, aparentemente possui estas características e apresenta atividade antifúngica para leveduras de *Paracoccidioides* sp. Uma discreta inibição fungica foi observada nos ensaios para determinação de atividade antifúngica (CIM) do SNL sem a incorporação das substâncias. Tal atividade poderia estar agindo sinergicamente com as substâncias antifúngicas (2-chalc e dodecila), isto devido ao uso do colesterol como fase oleosa, assim este pode modificar profundamente a velocidade de liberação das substâncias oferecendo benefícios que incluem a similaridade da membrana fúngica já esta está formada por fosfolipideos e ergosterol análogo ao coesterol o que permite a interação direta e imediata, desta forma também permite o aumento da solubilidade e o direcionamento para sítios especificos, diminuindo a toxicidade e aumentando a eficácia clínica da substâncias em estudo (AZEVEDO et al., 2005; PRETE et al., 2006; DIAS et al., 2007).

Vincular substâncias bioativas aos seus alvos celulares e moleculares é um desafio central na descoberta e desenvolvimento novos fármacos. Dessa forma estudamos as chalconas e os protocatecuatos, substâncias com ampla atividade biológica e potente atividade anti-*Paracoccidioides*, revelando serem bons candidatos para o desenvolvimento de protótipos antifúngicos.

Neste cenário, a identificação de novos alvos fúngicos de produtos naturais torna-se crucial para definir o seu efeito e o exato mecanismo de ação. Além disso, produtos naturais podem servir como ponte entre a química, biologia, nanotecnologia e a medicina, desempenhando o papel importante em nível molecular para o estudo de diferentes processos celulares em virtude da sua capacidade de se ligar à proteínas-alvos específicas e interferir nas funções celulares.

Atualmente, o constante progresso na tecnologia analítica, e, sobretudo da espectrometria de massas, novos caminhos estão se abrindo para o desenvolvimento de novas abordagens desempenhando um papel importante no campo da prospecção de alvos (MARGARUCCI, et al., 2012). Nosso grupo utilizou esta abordagem em diversos estudos e muitos alvos interessantes de diversos fungos patogênicos foram descobertos.

No primeiro trabalho de nosso laboratório utilizou-se extratos de *K. rubriflora* e *Kielmeyera rubriflora*, *a*mbos os extratos selecionados apresentaram valores de CIM inferiores a 75,0 μg/mL, tanto para *C. albicans* como para *C. krusei*, sendo assim, a atividade antifúngica foi considerada forte (SCORZONI et al., 2007; SCORZONI, 2008). Os valores de CFM variaram de 250 a 62,5 μg/mL para *C. albicans* e 125 a 62,5

μg/mL para *C. krusei*. Na sequencia deste estudo procurou-se verificar quais proteínas estariam envolvidas na resposta destas leveduras aos extratos de *K. rubriflora* e a droga fluconazol, empregada como controle (SCORZONI, 2007).

Os recursos para decifrar e utilizar os dados proteômicos no desenvolvimento de drogas mais eficazes e bem sucedidas foram relatados em vários trabalhos (WALGREN et al., 2004; KOPEC et al., 2005; GOMASE et al., 2008). Em outro estudo, foi relatado que proteínas envolvidas na síntese do ergosterol estavam alteradas e estas foram identificadas como alvos para o delineamemto de novas moléculas ativas (HOOSHDARAN et al., 2004).

Desta forma, a abordagem proteômica foi aplicada para darmos início à prospecção dos alvos envolvidos no mecanismo de ação de 2-hidroxichalcona (2-chalc) e a mesma incorporada no sistema nanoestruturado lipídico SNL. Inicialmente o proteôma total do isolado Pb 18 foi estabelecido como controle do perfil proteômico total do isolado para posterior comparação com o perfil proteômico do mesmo em contato com a molécula de 2-chalc não incorporada ao SN e do perfil proteômico desta incorporada no SNL. As análises comparativas dos géis 2D contendo os perfis revelaram aproximadamente 320 spots para cada situação (perfil proteico total do fungo, perfil proteico do fungo em contato com 2-chalc e perfil proteico do fungo em contato com 2-chalc + sistema nanoestruturado) observados nas figuras 34 e 35.

Para um melhor direcionamento de nosso estudo foram selecionados 240 spots diferencialmente expressos com base no ponto isoelétrico e massa molecular de adesinas de *Paracoccidioides brasiliensis* esta linhagem foi escolhida devido a apresentarem ótimos resultados já referidos anteriormente assim como é o principal objetivo de estudo do grupo e existe um banco de dados sobre o perfil proteico mais completo, além de ser previamente conhecidas com estudos publicados que caracterizaram suas proteínas com funções ligadas à adesão deste fungo na tabela 16.

Nossos resultados do sequenciamento e da identificação de 80 spots (supostas proteínas) foram realizados através de espectroscopia de massas MALDI TOF/TOF e foram categorizadas 39 proteínas com função metabólica, 10 com função relacionada à produção de energia, sete relacionadas ao ciclo celular e processamento, quatro à transcrição, sete proteínas foram consideradas hipotéticas, sete relacionadas à síntese proteica e seis proteínas relacionadas ao transporte, rearranjos e destinos. Dentre as várias proteínas identificadas, algumas se destacaram por já serem descritas na literatura e estarem envolvidas nos principais fatores de virulência e patogenicidade do complexo

Paracoccididoides. Identificamos proteínas metabólicas, proteínas relacionadas à produção de energia, ciclo celular e processamento, sínteses de proteínas, transcrição e proteínas hipotéticas nas três situações e no controle. No perfil proteômico quando tratado com 2-chalc e tratado com SNL+2-chalc, encontramos proteínas em comum em todas as situações e 80 proteínas foram sequenciadas observadas nas tabelas 17 a 20 e na figura 36.

Pela análise dessas proteínas foi possível observar que há uma diferença de expressão entre as células tratadas das não tratadas.

As proteínas de maior relevância foram discutidas a seguir:

A proteína "**crossover junction endonuclease mus81**". Proteína que atua durante a meiose dos cromossomos homólogos produzem uma invasão formado por uma junção dupla denominada quiasmas. Essas conexões são cruciais para a taxa de segregação de cromossomos homólogos por divisão meiótica (BASCOM-SLACK et al., 1997). Recentemente, dois grupos têm proposto que esrta proteína Mus81 é conhecida como parte da interferência no fenômeno de cruzamento positivo de um eucariótico (BODDY et al., 2001.; JONES, 1984). A mesma função foi encontrada para brotamento das levedura de *Saccharomyces cerevise* (CHEN et al., 2001) e Mus81 também está relacionada aos eventos de recombinação meiótica de DNA (LAP; HEYER, 2001).

As proteínas **ciclina A e B** também foram diferencialmente expressas e foi verificado que ambas parecem ser capazes de promover a passagem da mitose de oócitos (SWENSON et al., 1986;. MINSHULL et al., 1989; MURRAY, 1989a, MURRAY et al., 1989). A ciclina A tem um papel na iniciação da fase S. Os seus genes (CLN1, CLN2 e CLN3) foram relacionados com o brotamento de levedura de *S. cerevisiae* (SUDBERY et al., 1980; NASH et al., 1988). As ciclinas podem estar associadas com Cdc28/cdc2 que possivelmente estão relacionadas com a ativação da quinase e com isto inicia-se uma serie de vias de sinalização (WITTENBERG et al., 1990;. REED, 1991).

A proteína **ά N-acetil transferase** tem sido citada em estudos ao longo dos últimos anos e está relacionada a N-acetilacão de varias proteínas atribuindo assim varias funções importantes como proteínas de alvo subcelular (BEHNIA et al., 2007; STARHEIM et al., 2009). Em leveduras cinco diferentes tipos de N- acetil transferase (NAT) foram identificadas (POLEVODA B et al., 2003; POLEVODA B et al., 2009). Estas são compostas de uma subunidade catalítica responsável pela reação de acetilação,

e duas subunidades auxiliares, a proteína NAT está relacionada com os ribossomos, onde a reação de acetilação ocorre ocasionalmente com o peptídeo geralmente nos resíduos de 20 a 50 o que faz a expulsão do ribossomo (GAUTSCHI M et al., 2003, POLEVODA B et al., 2008).

Proteína **IQ calmodulin-binding** (CaM) é um Ca2þ receptor de proteína que regula as atividades e as funções de uma variedade de proteínas de ligação a CaM (CaMBPs que são proteínas de ligação ao cálcio), incluindo enzimas metabólicas e estruturais, fatores de transcrição, canais iônicos e proteína quinases/fosfatases. Nas células vegetais, estão atuando em processos de defesa contra os microorganismo e ao estresse coordenado por meio de cálcio como segundo mensageiro (SNEDDEN, 2001; HOEFLICH, 2002).

Glicogênio sintase-quinase 3 (GSK-3) também foi identificada como proteínas produtoras de energia. É uma enzima eucariótica presente em várias vias de sinalização.

A primeira função é a fosforilação da kinase de glicogênio sintase localizada no músculo esquelético de coelho e um número de alvos diferentes. Também foi encontrada com este mesmo nome no organismo humano (RAYASAM *et al*., 2009). Possui diferentes expressões de isoformas a qual outorga perfis e funções biológicas diferentes (LIANG; CHUANG, 2006).

Diferentes organismos também possuem mais de uma isoforma de GSK- 3: algumas foram identificados em *Saccharomyces cerevisiae* (KASSIR *et al*., 2006). Outras isoformas, GSK-3 homólogo foram encontradas em *Drosophila melanogaster* (HOSKINS *et al.,* 2007). A enzima glicogénio sintase quinase 3 (GSK-3) é um alvo validado para fármacos anti - protozoários. Foi demonstrado que os inibidores de A GSK - 3 pode ser utilizado contra o *Plasmodium falciparum* (DROUCHEAU et al., 2004), *Leishmania donovani* (XINGI et al., 2009), *Toxoplasma gondii* (QIN et al., 1998), *Trypanosoma brucei* e *Paracoccidioides brasiliensis* (OJO et al., 2008).

Outra proteína encontrada em nosso estudo foi a **proteína de transferência de fosfolipídio**s que facilita a transferência de PI (fofatidilinosito) e PC (fosfatidilcolina) em membranas biológicas e artificiais *in vitro.* Esta proteína é codificada pelo gene SEC14, que é necessária para o transporte de proteínas secretadas a partir do complexo de Golgi de levedura, e é essencial para a viabilidade das células (BANKAITIS et al., 2003). As PITPs (proteínas de transferência PI) foram encontradas em todos os eucariontes até agora e a partir de estudos em camundongos e *Drosophila melanogaster*,

onde insuficiências PITPs levaram a graves defeitos neurodegenerativos influenciando a expressão do gene Alb A (BANKAITIS et al., 2003; HAMILTON . et al., 1990).

No entanto, deve ser notado que PITPs em mamíferos é semelhante a Sec14p de *S. cerevisiae* em tamanho, ligação lipídica e propriedades de transferência, mas não têm homologia de sequência com a Sec14p (TANAKA; HOSAKA et al., 1994; CUNNINGHAM, TAN et al., 2006).

A **Proteína Microssomal NADPH-citocromo P-450** oxidoredutase também foi evidenciada e é uma proteína de 78225-dalton que catalisa o elétron transferência de flavoproteínas, apartir da qual o NADPH transfere o electron para o citocromo P-450, bem como para outras enzimas microssomais e vários receptores de electrons artificiais (MASTER. et al., 1980; ERNSTER et al., 1982).

Assim também podemos citar outras proteínas com estas características encontradas aqui principalmente, quando foi tratado com a 2-chalc e a SN+2-chalc. **Guanilato-quinase** (GK) catalisa transferência a reversível do grupo fosfato do ATP para GMP na presença de Mg^2. (AGARWAL et al, 1978;. LI et al., 1996.). GK desempenha um papel importante na síntese de precursores de nucleotídeos e no ciclo de cGMP. Esta enzima pode estar envolvida na transdução de sinal da guanina mediada por nucleotídeo através da regulação da GTP em relação ao PIB (WOODS; BRYANT, 1991).

A adenosina quinase (Ado quinase) que é uma enzima que catalisa a reação que o ADO + ADP AMP + ATP ↔ de uma maneira dependente de magnésio (SPYCHALA *et al*., 1996). Adenosina quinase é encontrada na maioria dos eucariotos, fungos, plantas e parasitas, mas raramente é encontrada em bactérias. Inibição da Ado (adenosina) - quinase tem sido o foco de pesquisa farmacológica nos seres humanos, bem como os parasitas *Toxoplasma gondii* e *Cryptosporidium parvum* (PIGNATARO et al., 2007; UGARKAR et al., 2003).

Além das já mencionadas várias proteínas presentes nas vias glicolítica e gliconeogênese foram encontradas. Segundo Palbhowmick e colaboradores (2004), estas participam do metabolismo energético e a reação é dependente de Mg^{2+}. Entretanto, numerosas propriedades não glicolíticas foram descritas para estas proteínas, como a capacidade de interagir com actina e tubulina humana. Estas possuem alta afinidade pela fibronectina e laminina, ligação que facilita a adesão de alguns

microrganismos às células do hospedeiro, e também se liga ao plasminogênio facilitando a invasão e disseminação de alguns patógenos (JOLODAR et al., 2003). Em nosso estudo estas proteínas foram expressas e identificadas como Enol CoA, fosfomanomutase, proteína tetratricopeptideo, e arrestina.

A malato desidrogenase faz parte do ciclo do ácido cítrico, precursor do ciclo do ácido tricarboxilico, essenciais para a produção de energia pela célula. Em *P. brasiliensis* este ciclo está envolvido diretamente com a via do glioxalato, possui como enzimas-chaves a isocitrato liase e malato sintase, que possuem papel na patogenicidade e virulência (ZAMBUZZI-CARVALHO et al., 2009).

Donofrio et al., (2009) identificaram em nosso laboratório uma molécula de 54 kDa, pI 5,6 que foi parcialmente caracterizada como enolase ligante de fibronectina, com o intuito de definirem a localização celular da enolase de *P. brasiliensis* durante a sua interação com pneumócitos sugeriram que esta encontra-se distribuída por toda a célula fúngica e desarranjos na conformação de fibrina, actina, tubulina e citoqueratina foram observados em todos os períodos de infecção avaliados. Sugere-se que estas alterações estejam associadas ao mecanismo de adesão e invasão do patógeno à célula do hospedeiro (DA SILVA MONTEIRO, 2004).

Também, De Fátima da Silva e colaboradores (2013), estudaram a função desta 14-3-3 de *P. brasiliensis* durante a infecção de linhagens celulares de pulmão humano A549 e por meio de microscopia eletrônica de transmissão esta proteína foi visualizada por técnica de Imunogold. Foi evidenciado que 14-3-3 era excretada do citoplasma para a membrana e desta era externalizado pelo fungo formando uma ponte de ligação entre a célula hospedeira e a levedura. Assim se concluiu neste estudo que esta poderia ser uma adesina importante no processo de adesão de *P. brasiliensis*. Além disso, ensaios de inibição desta proteína foram realizados durante a infecção do fungo e a adesão deste às células epiteliais de pulmão foi significativamente comprometida, mostrando ser este um potencial alvo terapêutico na paracoccidioidomicose.

Posteriormente, a localização da enolase foi confirmada por meio da realização de experimentos de microscopia eletrônica, mostrando que esta proteína encontra-se tanto na parede celular como no citoplasma de *P. brasiliensis*, quando o fungo foi cultivado em meio com acréscimo de sangue (MARCOS et al., 2012).

Dessa maneira, pode-se acreditar que a 2-hidroxichalcona influencia em vias metabólicas importantes do fungo e algumas destas proteínas atuam fazendo parte do processo de adesão, inviabilizando-o e impedindo a sua adesão às células hospedeiras assim como no metabolismo, síntese de RNA todas estas vias importante para a sobrevivência do fungo.

É importante ressaltar, que tais vias, também existentes nas células humanas não são afetadas, ou pelo menos, não na concentração considerada como inibitória para o fungo, já que nos testes de citotoxicidade, a porcentagem de células viáveis foi significativa até varias diluições acima da CIM. Contudo, foram encontradas proteínas alvos que podem ser muito promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos que possuam novos mecanismos de ação antifúngica.

Os resultados de nossa pesquisa mostram que as chalconas e os protocatecuatos em especial a 2-hidroxichalcona e o protocatecuato de dodecila e as mesmas incorporadas no nanocarreador seriam excelentes protótipos antifúngicos, já que eles mostraram uma potente atividade antifúngica e nenhum efeito citotóxico com alto índice de seletividade (IS) e com alvos proteicos que confirmam nossas premissa e muito relevantes para a pesquisa de novos fármacos tornando-os mais seguros para o tratamento da paracoccidioidomicose, e pode ainda tornar-se mais eficientes do que a anfotericina B já existente, que é conhecido por sua toxicidade sistêmica, incluindo renal, hepática e cardíaca, além de poder causar discracias sanguíneas e morte (BUTLER, 1966; FUKUI, 2003). Ainda o sistema pode-se tornar um excelente veículo para anfotericina B já se potencializou seus efeitos com um custo de produção muito menor do que já existe no mercado que é de altíssimo custo.

Ensaios *in vivo* serão necessários para a determinação da segurança e eficácia farmacológica deste protótipo e novas abordagens toxicológicas serão aplicadas para o desenvolvimento de um novo fármaco na terapêutica da paracoccidioidomicose.

6. CONCLUSÃO

As chalconas e os protocatecuatos em especial a 2-hidroxichalcona e o protocatecuato de dodecila apresentaram uma alta atividade antifúngica e viabilidade celular em media acima de 90%.

A incorporação do sistema nanoestruturado lipídico aumentou a atividade antifúngica em 60 vezes mais, a viabilidade celular em 10% e os índices de seletividade 2-100 vezes mais, mostrando a eficiência do sistema.

.

Como mecanismo de ação as substancias estudadas demonstraram inibir a adesão de 60 a 80% para 2-chalc e dodecila incorporados no sistema nanoestruturado aumento em 10% a 20% quando se compara só com elas.

Confirmando nosso mecanismo de ação através perfil proteômico, obtivemos 80 proteínas sequenciadas, sendo a maioria proteínas metabólicas e algumas adesinas, sendo elas essenciais para a sobrevivência do fungo.

Pelo já exposto a 2-hidroxichalcona e o dodecila, e as mesmas incorporadas no nanocarreador são muito promissoras para o tratamento da paracoccidioidomicose ainda podem se tornar excelentes protótipos antifúngicos para o desenvolvimento de novos fármacos e de interesse industrial para serem lançados no mercado já que a produção do nanocarreador demanda um baixo custo, além dos outros benefícios biológicos já mencionados e com resultados melhores dos fármacos padrões

Vale salientar que o sistema seria um excelente veículo inclusive para anfotericina B se comparamos com o que já existe no mercado de se torna mais viável pelo seu baixo custo...

7.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOOFAZELI, R.; BARLOW, D.; LAWRENCE, M.J., Particle size analysis of concentrated Phospholipid microemulsions II. Photon correlation spectroscopy. *APPS PharmSci*., v.2, n.3, E.19, 2000.

ABREU E SILVA MÀ, SALUM FG, FIGUEIREDO MA, CHERUBINI K. Important aspects of oral paracoccidioidomycosis--a literature review. **Mycoses**. v. 56, n. 3, p. 189-99, 2013.

AHLUWALIA VK, SHARMA ND, MITTAL B, GUPTA SR. Novel prenylated flavonoids from Mallotus philippinensis Muell. Arg. **Indian J. Chem**. n. 27B, p. 238 – 241, 1988.

AGARWAL, K. C., MIECH, R. P. & PARKS, R. E., Jr Guanylate kinases from human erythrocytes, hog brain, and rat liver. **Methods Enzymol**. N. 51, p. 483-491, 1978.

ALVES, R.. J. MAROTE, M. ARMAS, C. FREITAS, L. S. ALMEIDA, H. SEQUEIRA, MA GOMES, C. VERISSIMO, ML ROSADO, A. FARIA. Paracoccidioidomicose: caso clinic. **Med Cutan** Iber Lat Am; v. 41, n. 2, p.63-66, 2013.

ANDREOTTI, P. F. et al. Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from Paracoccidioides brasiliensis. **Microbes Infect,** v. 7, n. 5-6, p. 875-81, May 2005.

ASTICCIOLI, S., A. DI SILVERIO, L. SACCO, I. FUSI, L. VINCENTI, AND E. ROMERO**.** Dermatophyte infections in patients attending a tertiary care hospital in northern Italy**. New Microbiol**.v. 31, p. 543–548, 2008.

ASSAD C HARTMANN MJ, JOHNSON NJ, TOWAL RB,. Mechanical characteristics of rat vibrissae: resonant frequencies and damping in isolated whiskers and in the awakebehaving animal. **J Neurosci**. 2003 Jul23;23(16):6510-9}

AWADALLA, F., D. A. ROSENBAUM, F. CAMACHO, A. B. FLEISCHER, JR., AND S. R. FELDMAN. Dermatologic disease in family medicine. **Fam. Med**. v.40, p. 507–511, 2008.

AZIZ NH, FARAG SE, MOUSA LA, et al. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. **Microbios.** n. 93, p.:43–54, 1998.

BAGAGLI E, MACORIS SA, SUGIZAKI MF, PERAÇOLI MT, BOSCO SM, HEBELER-BARBOSA F, SIMÕES LB, THEODORO RC, TRINCA LA,. Virulence attenuation and phenotypic variation of Paracoccidioides brasiliensis isolates obtained from armadillos and patients. Mem **Inst Oswaldo Cruz**;101(3):331-4. **. 2006.**

BARBOSA, M. S. et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of Paracoccidioides brasiliensis is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. **Infect Immun,** v. 74, n. 1, p. 382-9, Jan 2006.

.

BABU, K. S. et al. Synthesis, antifungal activity, and structure-activity relationships of

coruscanone A analogues. **J Med Chem,** v. 49, n. 26, p. 7877-86, Dec 2006.
.
BANKAITIS, V.A. **J. Biol. Chem**. v. **278**, p. 33501–33518, 2003.

BANDOPADHYAY M, DHINGRA VK, MUKERJEE SK, PARDESHI NP, SESHADRI TR. Triterpenoid and other components of Mallotus philippinensis. **Phytochemistry**. n. 11 p. 1511, 1972

BANDAY AH, IQBAL ZARGAR M, GANAIE BA. Synthesis and antimicrobial studies of chalconyl pregnenolones. **Steroids**. v. 76, n. 12, p. 1358-62. 2011.

BARCHIESI F, COLOMBO AL, MCGOUGH DA, FOTHERGILL AW, RINALDI MG. In vitro activity of a new antifungal triazole, D0870, against Candida albicans isolates from oral cavities of patients infected with human immunodeficiency virus. **Antimicrob Agents Chemother**, V. 38, n. 11, p. 2553-6, 1994.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem,** v. 72, p. 248-54, 1976.
Bagwe RP, Kanicky JR, Palla BJ, Patanjali PK, Shah DO. Improved drug delivery using microemulsions: Rationale, recent progress, and new horizons. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 2001;18(1):77-140

BEHNIA R, BARR FA, FLANAGAN JJ, BARLOWE C, MUNRO S The yeast orthologue of GRASP65 forms a complex with a coiled-coil protein that contributes to ER to Golgi traffic. **J Cell Biol** n. 176, p. 255–261. 2007.

BENARD, G.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. RALPH D. FEIGIN; JAMES D. CHERRY; GAIL J. DEMMLER-HARRISON; SHELDON L. KAPLAN "Textbook of Pediatric Infections Diseases. In:, **Paracoccidioidomycosis", Elsevier Science**, vol. 2, pp. 2762-2776, 2009.

BHATACHARYA, S.; GHOSH, A. Phytosomes: the emerging technology for enhancement of bioavailability of botanicals and nutraceuticals. **Internet Journal of Aesthetic & Antiaging Medicine**, v. 2, n. 1, 2009

BHARGAVA, H.N.; NARURKAR, A.; LIEB, L.M.. Using microemulsions for drug delivery. **Pharm. Technol.**, v.3, p.46-54, 1987.
.
BHOWMICK R, LI M, SUN J, BAKER SA, INSINNA C, BESHARSE JC. Photoreceptor IFT complexes containing chaperones, guanylyl cyclase 1 and rhodopsin**.** **Traffic**. v. 10, n. 6, p. 648-63, 2009.

BOCCA AL, AMARAL AC, TEIXEIRA MM, SATO P, SHIKANAI-YASUDA MA, SOARES FELIPE MS. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. Future Microbiol. v.8, n. 9, p.1177-91, 2013.

BOIVIN, G., N. GOYETTE, AND J. SUTCLIFFE**.** NB-001, a novel nanoemulsion active against acyclovir (ACV)- and foscarnet (FOS)-resistant herpes simplex virus

(HSV) 1 and 2, abstr. V-3538. Abstr. 48th Intersci. Conf. Antimicrob. **Agents Chemother**. 2008.

BORELLI, D. Some ecological aspects of paracoccidioidomycosis. In: Pan American Health Organization. **Scientific Publication**. V. 254, p. 59-64, 1972.

BORGES-WALMSLEY, M. I. et al. The pathobiology of Paracoccidioides brasiliensis. **Trends Microbiol,** v. 10, n. 2, p. 80-7, Feb 2002.

BOIVIN, G., N. GOYETTE, AND J. SUTCLIFFE**.**. NB-001, a novel nanoemulsion active against acyclovir (ACV)- and foscarnet (FOS)-resistant herpes simplex virus (HSV) 1 and 2, abstr. V-3538. Abstr. 48th Intersci. Conf. Antimicrob. **Agents Chemother**. American Society for Microbiology, Washington, DC. 2008.

BASCOM-SLACK CA, ROSS LO, DAWSON DS. CHIASMATA, crossovers, and meiotic chromosome segregation. **Adv Genet**. n. 35 p. :253-84. 1997;

BODDY, M. N., A. LOPEZ-GIRONA, P. SHANAHAN, H. INTERTHAL, W. D. Heyer *et al.*, Damage tolerance protein mus81 associates with the FHA1 domain of checkpoint kinase cds1. **Mol. Cell**. **Biol**. n. 20, p. 8758–8766, 2000

BRANDÃO, G.C. Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of extracts and constituents from *Polygonum spectabile* Mart. **Phytomedicine**, v. 17 p. 926–929, 2010

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem,** v. 72, p. 248-54, May 1976.

BRINON, L.; GEIGER, S.; ALARD, V.; DOUCET, J.; TRANCHANT, J-T., COUARRAZE, G. Percutaneous absorption of sunscreens form liquid crystalline phases. **J. Control. Rel**., v.60, p.67-76, 1999.

BRUMMER, E., CASTANEDA, E., RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin. Microbiol.**, v. 6, p. 89-117, 1993.

BUTLER WT. Pharmacology, toxicity, and therapeutic usefulness of amphotericin B**. JAMA**. v. 31;195, n. 5, p. 371-5, 1966.

CALVO, T. R. et al. Constituents and antiulcer effect of Alchornea glandulosa: activation of cell proliferation in gastric mucosa during the healing process. **Biol Pharm Bull,** v. 30, n. 3, p. 451-9, 2007.

CAMPOS EP, PADOVANI CR, CATANEO AM. [Paracoccidioidomycosis: radiologic and pulmonary study in 58 cases]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 33(4):267-76. Portuguese. PubMed PMID: 1844948. 1991

CARNEIRO, L. C. et al. Paracoccidioides brasiliensis presents two different cDNAs encoding homologues of the fructose 1,6-biphosphate aldolase: protein isolation,

cloning of the cDNAs and genes, structural, phylogenetic, and expression analysis. **Fungal Genet Biol,** v. 42, n. 1, p. 51-60, Jan 2005.

CARRENO M.C.**, Chem. Rev**. n. 95, p. 1717e1760, 1999.

CASOTTO, M. Characterization of the cellular antigens of Paracoccidioides brasiliensis yeast form. **J Clin Microbiol,** v. 28, n. 6, p. 1188-93, Jun 1990.

CATALÁN M, MONTEJO JC. [Systemic antifungals. Pharmacodynamics and pharmacokinetics]. Re **Iberoam Micol**.;v. 23, n. 1, p. 39-49, 2006.

CECCHETTI E, SCORZONI D, CAMBRIA C, SCALIA P. [Contemporary presentation of unusual adverse events during telmisartan therapy]. **Recenti Prog Med**.;v. 103, n. 3, p. 98-9, 2012.

CLEMONS, K. V., FELDMAN, D., STEVENS, D. A. Influence of Oestradiol on protein expression and methionine utilization during morphogenesis of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Gen. Micro**., v. 135, p. 1607-1617, 1989.

CHAO CY, YIN MC. Antibacterial effects of roselle calyx extracts and protocatechuic acid in ground beef and apple juice. **Foodborne Pathog Dis**.v. 6, n. 2, p. 201-6, 2009.

CHENG, S. et al. The role of Candida albicans NOT5 in virulence depends upon diverse host factors in vivo. **Infect Immun,** v. 73, n. 11, p. 7190-7, Nov 2005.

CHINCHILLA R, NAJERA C., Recent Res. Dev. **Org. Chem**. n. 1, p. 437, 1997.

CLEMONS, K. V., FELDMAN, D., STEVENS, D. A. Influence of Oestradiol on protein expression and methionine utilization during morphogenesis of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Gen. Micro**., v. 135, p. 1607-1617, 1989.

CHAO CY, YIN MC. Antibacterial
CORTHAY A, JOHANSSON A, VESTBERG M, HOLMDAHL R. Collagen-induced arthritisdevelopment requires alpha beta T cells but not gamma delta T cells: studies with T cell-deficient (TCR mutant) mice. **Int Immunol**. v. 11, n. 7, p.1065-73. 1999.

COUTINHO, Z. F. et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad Saude Publica,** v. 18, n. 5, p. 1441-54, 2002 Sep-Oct 2002.

CONSTANTINIDES, P.P.; LANCASTER, C.M.; MARCELLO, J.; CHIOSSOME, D.C.; ORNER, D.; HIDALGO, I.; SMITH, P.L.; SARKAHIAN, A.B.; YIV, S.H.; OWEN, A.J. Enhanced intestinal absorption of an RGD peptide from water-in-oil microemulsions of different composition and particle size. *J. Control. Rel.*, v.34, p.109-116, 1995.
CORREA,

CRAWFORD, S.E., S. BOYLE-VAVRA, AND R.S. DAUM. Community associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus,*. *In* D.C. Hooper, M.W. Scheld, and J.M. Hughes (eds.), **Emerging infections**, v. 7, p. 153-79, 2007.

CSABA, N.; KOPING-HOGGARD, M.; ALONSO, M. Ionically crosslinked chitosan/ tripolyphoshpate nanoparticle of oligonucleotide and plasmid DNA delivery. **Int. J. Pharm.,** v. 382, p. 205-214, 2009.

CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. The current role of the reference procedures by CLSI and EUCAST in the detection of resistance to antifungal agents in vitro. **Expert Rev Anti Infect Ther,** v. 8, n. 3, p. 267-76, 2010.

CUNNINGHAM, E., TAN, S.K., SWIGART, P., HSUAN, J., BANKAITIS, V. AND COCKCROFT, S. Proc. Natl. **Acad**. **Sci**. U.S.A. n. 93, p. 6589–6593, 1996.

CUNHA-JÚNIOR, A.; FIALHO, S.L.; CARNEIRO, L.B.; ORÉFICE F. Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica. *Arq. Bras. Oftal.*, v.63, p.285-391, 2003

DA FONSECA, C. A. et al. Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from Paracoccidioides brasiliensis. **Microbes Infect,** v. 3, n. 7, p. 535-42, 2001.

DAMASCENO, B.P.G.L.1,2; SILVA, J.A.3; OLIVEIRA, E.E.1,2; SILVEIRA, W.L.L.2; ARAÚJO, I.B.2; OLIVEIRA, A.G.4; EGITO, E.S.T. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 32, n. 1, p. 9-18. 2011.

DA SILVA NETO, B. R. et al. The malate synthase of Paracoccidioides brasiliensis is a linked surface protein that behaves as an anchorless adhesin. **BMC Microbiol,** v. 9, p. 272, 2009.

DA SILVA, V. C., Characterization of gallotannins from Astronium species by flow injection analysis- electrospray ionization-ion trap-tandem mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of- flight mass spectrometry. **Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng),** v. 17, n. 4, p. 365-75, 2011.

DA SILVA J DE F, DE OLIVEIRA HC, MARCOS CM, DA SILVA RA, DA COSTA TA, CALICH VL, ALMEIDA AM, MENDES-GIANNINI MJ. Paracoccidoides brasiliensis 30 kDa adhesin:identification as a 14-3-3 protein, cloning and subcellular localization in infection models. **PLoS One**. v. 30 n. 8 p. 4, 2013.

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

DIAS, M.L.N.; CARVALHO, J.P.; RODRIGUES, D.G.; MARANHÃO, R.C. Pharmacokinetics and tumor uptake of a derivatized form of paclitaxel associated to a cholesterol-rich nanoemulsion (LDE) in patients with gynecologic cancers. **Canc. Chem. Pharmacol**., v.59, p.105-111, 2007.

DÍEZ, S. et al. Paracoccidioides brasiliensis 87-kilodalton antigen, a heat shock protein useful in diagnosis: characterization, purification, and detection in biopsy material via immunohistochemistry. **J Clin Microbiol,** v. 40, n. 2, p. 359-65, Feb 2002

DOMON, B.; AEBERSOLD, R. Mass spectrometry and protein analysis. **Science,** v. 312, n. 5771, p. 212-7, 2006.

DONOFRIO, F. C. et al. Enolase from Paracoccidioides brasiliensis: isolation and identification as a fibronectin-binding protein. **J Med Microbiol,** v. 58, n. Pt 6, p. 706-13, 2009.

DROUCHEAU, E., PRIMOT, A., THOMAS, V., MATTEI, D., KNOCKAERT, M., RICHARDSON, C., SALLICANDRO, P., ALANO, P., JAFARSHAD, A., BARATTE, B., KUNICK, C., PARZY, D., PEARL, L., DOERIG, C. AND MEIJER, L. Plasmodium falciparum glycogen synthase kinase-3: molecular model, expression, intracellular localisation and selective inhibitors**. Biochimica et Biophysica Acta n.** 1607, p. 181–196, 2004.

EZRAHI, S.; ASERIN, A.; GARTI, N. Aggregation behavior in one-phase (Winsor IV) microemulsion systems. In: KUMAR, P.; MITTAL, K.L., ed. *Handkook of Microemulsion Science and Technology.* New York: **Marcel Dekker**, cap.7, p.195-240. 1999.

ERNSTER, L., LIND, C., NORDENBRAND, K., THOR, H., AND ORRENIUS, S. in *Oxygenases* and Oxygen Metabolism (Nozaki, M., Yamamoto, S., Ishimura, Y., Coon, M., Ernster, L., and Estabrook, R., eds p. 357-369, 1982.

EL-AASSER M.S., SUDOl E.D., Miniemulsions: overview of research andapplications, **JCT. Res.** v. 1, n. 1, p. 21–31, 2004

FAMAP- NUTRIÇÃO PARENTERAL. Emulsões lipídicas TCM/TCL, 2008. [Online] Disponível em: http://www.famap.com.br/lipides.asp Acesso em: 10, Jan., 2008.

FARKAS, E.; ZELKÓ, R.; NÉMETH, Zs.; PÁLINKÁS, J.; MARTON S.; RÁCZ, I. The effect of liquid crystalline structure on chlorhexidine diacetate release. **Int. J. Pharm**., v.193, p.239-245, 2001.

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

FERNANDES, L. et al. Transcriptional profile of ras1 and ras2 and the potential role of farnesylation in the dimorphism of the human pathogen Paracoccidioides brasiliensis. **FEMS Yeast Res,** v. 8, n. 2, p. 300-10, 2008.

FERNANDEZ MA, GARCIA MD, AND SAENZ MT. Antibacterial activity of the phenolic acids fractions of Scrophularia frutescens and Scrophularia sambucifolia. **J Ethnopharmacol** n. 26, p. 11–14, 1996

FERREIRA-DA-CRUZ, M. F.; GALVÃO-CASTRO, B.; DANIEL-RIBEIRO, C. Isolation and antigenicity of a 45-kilodalton Paracoccidioides brasiliensis immunodominant antigen. **Infect Immun,** v. 60, n. 7, p. 2667-71, 1992..

FONSECA CA, JESUINO RSA, FELIPE MSS, CUNHA DA, BRITO W & SOARES CMA Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from Paracoccidioides brasiliensis**. Microbes Infect**. n. 3, p. 535–542, 2001.

FORMARIZ, T.P.; URBAN, M.C.C.; A.A. SILVA-JÚNIOR; GREMIÃO, M.D.; OLIVEIRA, A.G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. *Rev*. ***Bras. Ciên. Farmac***., v.41, p.301-313, 2005

FORMARIZ, T.P.; SARMENTO, V.H.V; SILVA-JÚNIOR, A.A.; SCARPA, M.V.; SANTILLI, C.V.; OLIVEIRA, A.G.. Doxorubicin biocompatible O/W microemulsion stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine. **Coll. Surf. B-Biointerf**., v.51, p.54-61, 2006.

FORMARIZ, T. P.; CHIAVACCI, L. A.; SARMENTO, V. H. S.; SANTILLI, C. V.; EGITO, E. S. T.; OLIVEIRA, A. G. Relationship between structural features and in vitro release of doxorubicin from biocompatible anionic microemulsion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 60, p. 28-35, 2007.

FORMARIZ, T. P.; CHIAVACCI, L. A.; SARMENTO, V. H. S.; FRANZINI, C. M.; SILVA-JR, A. A.; SCARPA, M. V.; SANTILLI, C. V.; EGITO, E. S. T.; OLIVEIRA, A. G. Structural changes of biocompatible neutral microemulsions stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine and its relationship with doxorubicin release. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 63, p. 287-295, 2008.

FORMARIZ, T. P.; CHIAVACCI, L. A.; SCARPA, M. V.; SILVA-JÚNIOR, A. A.; EGITO, E. S. T.; TERRUGI, C. H. B.; FRANZINI, C. M.; SARMENTO, V. H. V.; OLIVEIRA, A. G. Structure and viscoelastic behavior of pharmaceutical biocompatible anionic microemulsions containing the antitumoral drug compound doxorubicin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.77, p. 47-53, 2010.

FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton**: CRC Press**, 1994.

FUKUDA M, OHKOSHI E, MAKINO M, FUJIMOTO Y. Studies on the constituents of the leaves of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) and their cytotoxic activity. **Chem Pharm Bull**. n. 54, p. 1465 – 1468, 2006.

FUKUI H, KOIKE T, SAHEKI A, SONOKE S, TOMII Y, SEKI J. Evaluation of the efficacy and toxicity of amphotericin B incorporated in lipid nano-sphere (LNS). **Int J Pharm**.v. 16;263, n. (1-2), p. 51-60. 2003.

GABBOUN, N.H.; NAJIB, N.M.; IBRAHIM, H.G.; ASSAF, S. Release of salicylic acid and diclofenac acid salts from isotropic and anisotropic nonionic surfactant sustems across rat skin. **Int. J**. **Pharm.,** Amsterdam, v.212, p.73-80, 2001.

GABIZON, A.A. Liposomal antracyclines. **Hematol. Oncol. Clin. North Am**., v.8, p.431-450, 1994.

GARCÍA BLANCO, S. et al. Differential PbP27 expression in the yeast and mycelial forms of the Paracoccidioides brasiliensis species complex. **Fungal Genet Biol**, Sep 2011.

GHASEMZADEH, A.; JAAFAR, H. Z.; RAHMAT, A. Elevated carbon dioxide increases contents of flavonoids and phenolic compounds, and antioxidant activities in Malaysian young ginger (Zingiber officinale Roscoe.) varieties. **Molecules,** v. 15, n. 11, p. 7907-22, 2010.

GRAVES, P. R.; HAYSTEAD, T. A. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiol Mol Biol Rev,** v. 66, n. 1, p. 39-63; table of contents, 2002.

GAUTSCHI M, JUST S, MUN A, ROSS S, RÜCKNAGEL P, DUBAQUIÉ Y,EHRENHOFER-MURRAY A, ROSPERT S. The yeast N(alpha)-acetyltransferase NatA is quantitativelyanchored ,o the ribosome and interacts with nascent polypeptides**.** **Mol Cell Biol. Oct**., v. 23, n. 20, p. 7403-14, 2003.

GONZÁLEZ, A., Purification and partial characterization of a Paracoccidioides brasiliensis protein with capacity to bind to extracellular matrix proteins. **Infect Immun,** v. 73, n. 4, p. 2486-95, Apr 2005.
GOMASE VS, KALE KV, TAGORE S, HATTURE SR. Proteomics: technologies for protein analysis. **Curr Drug Metab**.v. 9, n. 3, p. 213-20, 2008.

GURGEL, R. Q., SILVA, A. M., OLIVEIRA, R. C. V. Creche: ambiente expositor ou protetor nas infecções por parasitas intestinais em Aracaju, SE. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, v.38, p.267-269, 2005.

GUSTAFSSON, J.; LJUSBERG-WAHREN, H.; ALMGREN, M.; LARSSON, K. Submicron particles of reversed lipid phases in water stabilized by nonionic amphiphilic polymer. *Lang.*, v.13, p.6964-6971, 1997. HAMOUDA, T., AND J. R. BAKER, JR**.**. Antimicrobial mechanism of action of surfactant lipid preparations in enteric gram-negative bacilli. J. **Appl. Microbiol**. **n. 89 p.** 397–403. 2000.

HAMILTON, B.A., SMITH, D.J., MUELLER, K.L., KERREBROCK, A.W., BRONSON, R.T., VAN BERKEL, V., DALY, M.J., KRUGLYAK, L., REEVE, M.P., Nemhauser, J.L. et al. **Neuron n**. **18**, p. 711–722, 1997.

HAMOUDA, T., AND J. R. BAKER, Jr**.**. Antimicrobial mechanism of action of surfactant lipid preparations in enteric gram-negative bacilli. **J. Appl. Microbiol**. v. 89 p**.** 397–403, 2000.

HANNA, S. A.; MONTEIRO DA SILVA, J. L.; GIANNINI, M. J. Adherence and intracellular parasitism of Paracoccidioides brasiliensis in Vero cells. **Microbes Infect,** v. 2, n. 8, p. 877-84, Jul 2000

HARPUT, U.S., GENC, Y., KHAN, N., SARACOGLU, I. Radical scavenging effects of different Veronica species. **Rec. Nat. Prod**. n. 5, p. 100–107, 2011.

HOEFLICH KP AND IKURA M Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms. **Cell. Cell** n. 108, p. 739–742, 2002.

HOOSHDARAN MZ, BARKER KS, HILLIARD GM, KUSCH H, MORSCHHÄUSER J, ROGERS PD. Proteomic analysis of azole resistance in Candida albicans clinical isolates**. Antimicrob Agents Chemother**. v. 48, n. 7, p. 2733-5, 2004.

HOSKINS, R. A., CARLSON, J.W., KENNEDY, C., ACEVEDO, D., EVANS-HOLM, M., FRISE, E., WAN, K. H., PARK, S., MENDEZ-LAGO, M., ROSSI, F., VILLASANTE, A., DIMITRI, P., KARPEN, G. H. AND CELNIKER, S. E. Sequence finishing and mapping of Drosophila melanogaster heterochromatin. **Science** n. 316, p. 1625–1628, 2007.

HUGHES RC, **Essays Biochem**., v. 11, p. 1 1975.

JOHANN, S. et al. Antifungal activity of extracts of some plants used in Brazilian traditional medicine against the pathogenic fungus Paracoccidioides brasiliensis. **Pharm Biol,** v. 48, n. 4, p. 388-96, Apr 2010.

JOHANN, S. Antifungal activity of schinol and a new biphenyl compound isolated from Schinus terebinthifolius against the pathogenic fungus Paracoccidioides brasiliensis. **Ann Clin Microbiol Antimicrob,** v. 9, p. 30, 2010.

JOLODAR A, FISCHER P, BERGMANN S, BÜTTNER DW, HAMMERSCHMIDT S, BRATTIG NW. Molecular cloning of an alpha-enolase from the human filarial parasite Onchocerca volvulus that binds human plasminogen. **Biochim Biophys Acta**. v.19 , n .2-3, p. 111-20, 2003.

JANES, K.; ALONSO, M. J. Depolymerized chitosan nanoparticle for protein delivery: preparation and characterization, **Appl. Polym. Sci.** v. 12, p. 2769-2776, 2003.
JUNGBLUT, P.; WITTMANN-LIEBOLD, B. Protein analysis on a genomic scale. **J Biotechnol,** v. 41, n. 2-3, p. 111-20, 1995.

KARIMI, E.; JAAFAR, H. Z.; AHMAD, S. Phytochemical analysis and antimicrobial activities of methanolic extracts of leaf, stem and root from different varieties of Labisa pumila Benth. **Molecules,** v. 16, n. 6, p. 4438-50, 2011.

KASSIR Y, RUBIN-BEJERANO I, MANDEL-GUTFREUND Y. The Saccharomyces cerevisiae GSK-3 beta homologs. **Curr Drug Targets**.;v. 7, n. 11, p. 1455-65, 2006.

KATO, M. J. Global phytochemistry: the Brazilian approach. **Phytochemistry,** v. 57, n. 5, p. 621-3, 2001.

KATSORI A.M., HADJIPAVLOU-LITINA, D. Recent progress in therapeutic application of chalcones. **Expert. Opin Ther. Pat.**, 2011.

KESARWANI, K.; GUPTA, R. Bioavailability enhancers of herbal origin: An overview. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 4, p. 253-266, 2013.

KONDURU NK, DEY S, SAJID M, OWAIS M, AHMED N. Synthesis and antibacterial and antifungal evaluation of some chalcone based sulfones and bisulfones. **Eur J Med Chem**. n. 59, p. 23-30, 2013.

KOPEC KK, BOZYCZKO-COYNE D, WILLIAMS M. Target identification and validation in drug discovery: the role of proteomics. Biochem **Pharmacol**. v. 15;69, n. 8p. 1133-9. 2005.

KULKARNI RR, TUPE SG, GAMPLE SP, CHANDGUDE MG, SARKAR D, DESHPANDE MV, JOSHI SP. Antifungal dimeric chalcone derivative kamalachalcone E from Mallotus philippinensis. **Nat Prod Res**. 2013.

KUBO, I.; MUROI, H.; KUBO, A. Structural functions of antimicrobial long-chain alcohols and phenols. **Bioorg Med Chem,** v. 3, n. 7, p. 873-80, Jul 1995.

LACAZ, C.S. *Paracoccidioides brasiliensis*: morphology, evolutionary cycle, maintenance during saprophytic life, biology, virulence, taxonomy. In: Franco M., LACAZ C. S., RESTREPO MORENO A., DEL NEGRO G**. Paracoccidiodomycosis**. (ed.) Boca Raton: CRC., p. 20-27, 1994.

LACHMAN, L; LIBERMAN, H.; KANIG, L.J. Teoria e Prática na indústria farmacêutica. 3ed**. Philadelphia: Lea & Febiger**, p.1143, 2001.

LAEMMILI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. 227**:** 680-5 p. 1970.
LAWRENCE, M.J; REES, D.G. Microemulsions-based as novel drug delivery systems. **Adv. Drug Deliv. Rev.,** v.45, p.89-121, 2000.

LEGRAND, P. BARRATT, G. MOSQUEIRA, V.D.F.; FESSI, H. DEVISSAGUET, F.; Polymeric nanocapsule as drugs delivery sistem: **Pharm. Sci**., v. 9, p. 411-418, 1999.

LIANG, M.-H. AND CHUANG, D.-M. DIFFERENTIAl Roles of Glycogen Synthase Kinase-3 Isoforms in the Regulation of Transcriptional. Activation. **The Journal of Biological Chemistry** n. 281, p. 30479–30484, 2006.

LI, Y. L. et al. [Study on the chemical constituents of Ardisia chinensis]. **Zhong Yao Cai,** v. 29, n. 4, p. 331-3, 2006.

LI, Y., ZHANG, Y. & YAN, H. Kinetic and thermodynamic characterizations of yeast guanylate kinase. J. Biol. Chem. v. 271, p. 28038-28044, 1996.

LIU WH, HSU CC, AND YIN MC. In vitro anti-Helicobacter pylori activity of diallyl sulphides and protocatechuic acid. **Phytother** Res; n. 22, p. 53–57, 2008.

MADRIGAL-CARBALLO S, VILA AO, SIBAJA, M, REED J, MOLINA F, *J. Liposome* **Res.** (doi: 11.987/236599654551089614) (2009).

MANN, M. Functional and quantitative proteomics using SILAC. **Nat Rev Mol Cell Biol,** v. 7, n. 12, p. 952-8, 2006.

MARANHÃO, R.C.; GARICOCHEA, B.; SILVA, E.L.; LLACERDORLHIAC, P.; CADENA, S.M.S.; COELHO, I.J.C.; MENEGHETTI, J.C.; PILEGGI, F.J.C.; CHAMONE, D.A.F. Plasma Kinetics and Biodistribution of a Lipid Emulsion Resembling Low-Density Lipoprotein in Patients with Acute Leukemia. ***Canc. Res.,*** v.54, p.4660-4666, 1994.

MARCOS CM, DE FÁTIMA DA SILVA J, DE OLIVEIRA HC, MORAES DA SILVA RA, MENDES-GIANNINI MJ, FUSCO-ALMEIDA AM. Surface-expressed enolase contributes to the adhesion of Paracoccidioides brasiliensis to host cells. FEMS **Yeast Res**. v. 12, n. 5, p.557-70, 2012.

MARGARUCCI L, MONTI MC, MENCARELLI A, CASSIANO C, FIORUCCI S, RICCIO R, ZAMPELLA A, CASAPULLO A. Heat shock proteins as key biological targets of themarine natural cyclopeptide perthamide **C. Mol Biosyst**.. v. 8, n. 5, p. 1412-7, 2012.

MARRAPU VK, CHATURVEDI V, SINGH S, SINGH S, SINHA S, BHANDARI K. Novel aryloxy azolyl chalcones with potent activity against Mycobacterium tuberculosis H37Rv.**Eur** J Med Chem.;46(9):4302-10 2011.

MASTERS, B. S. S. *in Enzymatic Basis of Detoxification*, 1980.

MATUTE DR, SEPULVEDA VE, QUESADA LM, GOLDMAN GH, TAYLOR JW, RESTREPO A, MCEWEN JG. Microsatellite analysis of three phylogenetic species of Paracoccidioides brasiliensis. **J Clin Microbiol**, v.44, p.2153-7, 2006.

MYC, A., T. VANHECKE, J. J. LANDERS, T. HAMOUDA, AND J. R. BAKER, JR. The fungicidal activity of novel nanoemulsion (X8W60PC) against clinically important yeast and filamentous fungi. **Mycopathologia 155:**195–201. 2002.

MAYAYO E, LÓPEZ-ARACIL V, FERNÁNDEZ-TORRES B, MAYAYO R, DOMÍNGUEZ M. Report of na imported cutaneous disseminated case of paracoccidioidomycosis. **Rev Ibero Am Micol** n. 24, p. 44-6, 2007.

MEAD, P.S., SLUTSKER, L., DETZ, V., MCCAIG, L.F., BREESE, J.S., SHAPIRO, C., GRIFFIN, P.M., TAUXE, R.V. Food related illness and dead in the United States. **Emerg. Infect.** Dis. n. 5, p. 607–625, 1999

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; TAYLOR, M. L.; BOUCHARA, J. B et al. Pathogenesis II: Fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. **Med. Mycol**., v.38, p. 113-123, 2000.

MENDES-GIANNINI, M.J.; SOARES, C.P.; DA SILVA, J.L.; ANDREOTTI, P.F. Interaction of pathogenic fungi with host cells: Molecular and cellular approaches. FEMS Immunol. Med. **Microbiol**., v. 45, p. 383-394, 2005.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; MELHEM, M. S. C.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. Infecções fúngicas. In: FERREIRA, A. W. e ÁVILA, S. (Ed.). **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan v.3, 2012.

MENDES PR, REIS VL, TAVARES W. Paracoccidioidomycosis. In: Tavares W, Marinho LAC (eds), Routines of Diagnosis and Treatment of Infectious and Parasitic Diseases. São Paulo: **Atheneu**, 2007: 787–805.
MINSHULL, J., J.J. BLOW, AND T. HUNT. Translation of cyclin mRNA is necessary for extracts of activated *Xenopus* eggs to enter mitosis. **Cell** *n.* 56, p. 947-956, 1989.

MORAES M. C.; LUQMAN, S.; KONDRATYUK, T. P.; PETRÔNIO, M. S.; REGASINI, L. O.; SILVA, D. H.; BOLZANI, V. S.; SOARES, C. P.; PEZZUTO, "Suppression of TNF- α induced NFκB activity by gallic acid and its semi- synthetic esters: possible role in cancer chemoprevention". **Natural Products Research** vol. **24**, pp. 1758-1765, 2010.

MUNOZ-CENTENO, L.M., DELGADO-SANCHEZ, L., SANTOS-VICENTE, M., MARTINEZ-ORTEGA, M.M., Taxonomy of Veronica L. subsect. Veronica (Plantaginaceae) in the western Mediterranean. Bot. J. Linn. Soc. n. 155, p. 65–81, 2007.

MURRAY, A.W., M.J. SOLOMON, AND M.W. KIRSCHNER.. The role of cyclin synthesis in the control of maturation promoting factor activity. **Nature** n**.** 339, p. 280-286, 1989.

MURRAY, A.W. AND M.W. KIRSCHNER. Dominoes and clocks: The union of two views of the cell cycle. *Science* 246: 614-621. 1989b. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. **Nature** n. 339: p. 275-280, 1989a

NAJERA C.; SANSANO J.M, Recent Res. Dev. **Org. Chem**. n. 2, p. 637, 1998..

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antimicrobial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, 31, p. 247-256. 2000.

NAIR SP, MADHUSUDANA RAO J. Kamaladiol-3-acetate from the stem bark of Mallotus philippinensis. **Phytochemistry**. n. 32, p. 407 – 409. 1993.

NATTA, L., ORAPIN, K., KRITTIKA, N., PANTIP, P.B. Essential oil from zingi beraceae for anti food borne bacteria. **Int. Food Res**. J. n. 15, p. 337–346, 2008.

NASH, R., G. TOKIWA, S. ANAND, K. ERICKSON, AND A.B. FUTCHER. The *WHI1* + gene of *Saccharomyces cerevisiae* tethers cell division to cell size and is a cyclin homolog. **EMBO J.** n. 7 p. 4335—4346, 1988.

NGUYEN TM, CHAU VM, PHAN VK, NGUYEN HK, NGUYEN XC, NGUYEN HD, NGUYEN PT, NGUYEN HN, LA DM, NINH KB. Study on chemical constituents of the leaves of Mallotus philippensis. **Tap Chi Hoa Hoc**. n. 48, p. 352 – 357, 2010a

NGUYEN TM, NGUYEN XC, NGUYEN PT, NGUYEN HN, NGUYEN HK, MINH CV, VANDER HEYDEN Y, THUAN NT, NGUYEN VT, QUETIN-LECLERCQ J. A new lignan dimer from Mallotus philippensis. **Nat. Prod. Commun**. n. 5, p. 423 – 426, 2010b.

OJO, K. K., GILLESPIE, J. R., RIECHERS, A. J., NAPULI, A. J.,VERLINDE, C. L. M. J., BUCKNER, F. S., GELB, M. H., DOMOSTOJ, M. M., WELLS, S. J., SCHEER, A., WELLS, T. N. C. AND VAN VOORHIS, W. C. Glycogen synthase kinase 3 is a potential drug target for african trypanosomiasis therapy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy n. 52, p. 3710–3717. 2008.

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V. Microemulsões I: fundamentos teóricos da formação do sistema microemulsionado. **Infar**., v.1, p.73-79, 2001.

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V.; CORREA, M.A.; CERA, L.F.R.; FORMARIZ, T.P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Quim**. *Nov*., v.27, p.131-138, 2004.

PAL-BHOWMICK I, SADAGOPAN K, VORA HK, SEHGAL A, SHARMA S, JARORI GK. Cloning, over-expression, purification and characterization of Plasmodium falciparum enolase. **Eur J Biochem**.; v. 271, n. 23-24, p. 4845-54, 2004.

PANIAGO AMM, AGUIAR JIA, AGUIAR ES, CUNHA RV, PEREIRA GROL, LONDERO AT, WANKE B Paracoccidioidomicose: estudo clínico e epidemiológico de 422 casos observados no estado de Mato Grosso do Sul. **Rev Soc Bras Med Trop. n.** *36*, p. 455-459, 2003.

PANNU, J., A. MCCARTHY, A. MARTIN, T. HAMOUDA, AND J. Sutcliffe**.**, a novel nanoemulsion with anti-dermatophyte activity, abstr. M-2134. Abstr. 48th Intersci**. Conf. Antimicrob. Agents Chemother.** 2008.

PARK, J. B.; SEO, B. C.; KIM, J. R.; PEK, U. H.; PARK, Y. K. Effect of glucose concentration on the production of erythritol by Trichosporon sp. J. **Microbiol. Biotechnol**. 8(5):543-546, 1998.

PARK, J. Y. Characteristic of alkylated chalcones from Angelica keiskei on influenza virus neuraminidase inhibition. **Bioorg Med Chem Lett,** v. 21, n. 18, p. 5602-4, Sep 2011.

.

PATTI, J. L., B. L. ALLEN, M. J. MCGAVIN, AND M. HOOK.. MSCRAM. Mediated adherence of microorganisms to host tissues. Annu**. Rev. Microbiol**. n. 48, p. 585–617, 1994.

PRETE, A.C.L.; MARIA, D.A.; RODRIGUES, D.G.; VALDUGA, C.J.; IBANEZ, O.C.; MARANHAO, R.C. Evaluation in melanoma-bearing mice of an etoposide derivative associated to a cholesterol-rich nanoemulsion. **J. Pharm. Pharmacol**., v.58, p.801-808, 2006.

PERLROTH J, CHOI B, SPELLBERG B. Nosocomial fungal infections: epidemiology,diagnosis, and treatment. **Med Mycol**. 45(4):321-46.2007

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **Am J Med,** v. 125, n. 1 Suppl, p. S3-13, 2012.

PEREIRA, L. A. et al. Analysis of the Paracoccidioides brasiliensis triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. **FEMS Yeast Res,** v. 7, n. 8, p. 1381-8, Dec 2007.

PICERNO, P. et al. Screening of a polar extract of Paeonia rockii: composition and antioxidant and antifungal activities. **J Ethnopharmacol,** v. 138, n. 3, p. 705-12, 2011.

POLEVODA B, CARDILLO TS, DOYLE TC, BEDI GS, SHERMAN F Nat3p and Mdm20p are required for function of yeast NatB Nalpha-terminal acetyltransferase and of actin and tropomyosin. J **Biol Chem** n. 278, p. 30686–30697, .2003.

POLEVODA B, BROWN S, CARDILLO TS, RIGBY S, SHERMAN F Yeast N(alpha)- terminal acetyltransferases are associated with ribosomes. **J Cell Biochem** n. 103, p. 492–508, 2008.

POLEVODA B, ARNESEN T, SHERMAN F A synopsis of eukaryotic Nalphaterminal acetyltransferases: nomenclature, subunits and substrates. **BMC Proc**. 3(Suppl 6): S2, 2009.

PRADO, M.; QUIRÓS, D.; LOMONTE, B. Mortality due to Hymenoptera stings in Costa Rica, 1985-2006. **Rev Panam Salud Publica,** v. 25, n. 5, p. 389-93, May 2009.

PIGNATARO G, MAYSAMI S, STUDER FE, WILZ A, SIMON RP, BOISON D. Downregulation of hippocampal adenosine kinase after focal ischemia as potential endogenous neuroprotective mechanism. **J Cereb Blood Flow Metab**.;v. 28, n. 1, p. 17-23, 2008.

PRADO L DE G, ARAÚJO SILVA. DE A, VELOSO JM, PEDROSO ER. Case of recurrent Paracoccidioidomycosis: 25 years after initial treatment. Braz **J Infect Dis**. 2009

PRADO, M.; QUIRÓS, D.; LOMONTE, B. Mortality due to Hymenoptera stings in Costa Rica, 1985-2006. **Rev Panam Salud Publica,** v. 25, n. 5, p. 389-93, May 2009.

PRETE, A.C.L.; MARIA, D.A.; RODRIGUES, D.G.; VALDUGA, C.J.; IBANEZ, O.C.; MARANHAO, R.C. Evaluation in melanoma-bearing mice of an etoposide derivative associated to a cholesterol-rich nanoemulsion. **J. Pharm. Pharmacol**., v.58, p.801-808, 2006.

ORTIZ BL, MCEWEN JG, GARCÍA AM, FLOREZ AM, BOTERO S, RESTREPO A. Molecular cloning, nucleotide sequencing, and characterization of a 27-kDa antigenic protein from Paracoccidioides brasiliensis. **Fungal Genet Biol**.;v. 20, n. 2, p. 125-31. 1996.

RAJENDRAN, R.; RADHAI, R.; KOTRESH, T. M.; CSISZAR, E. Development of antimicrobial cotton fabrics using herb loaded nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 613-617, 2013.

RAPPLEYE, C. A.; GOLDMAN, W. E. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. **.**60, P. 281-303, 2006.

RAYASAM GV, TULASI VK, SODHI R, DAVIS JA, RAY A. Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake. **Br J Pharmacol.**; v. 156, n. 6, p. 885-98, 2009.

REED, ST AND C. WITTENBERG . A mitotic role for the Cdc28 protein kinase of *S. cerevisiae***. Proc Natl. Acad.** *Sci.* n. 87, p *5697-570, .* 1990.

REDDY, K. H.; SHARMA, P. V.; REDDY, O. V. A comparative in vitro study on antifungal and antioxidant activities of Nervilia aragoana and Atlantia monophylla. **Pharm Biol,** v. 48, n. 5, p. 595-602, May 2010.

REIS, B.; MARTINS, M.; BARRETO, B.; MILHAZES, N.; GARRIDO, M.; SILVA, P.; SILVA, P.; GARRIDO, J.; BORGES, F. Structure-Property-Activity Relationship of Phenolic Acids and Derivatives. Protocatechuic Acid Alkyl Esters. **J. Agric. Food Chem**., v. 58, p. 6986, 2010.

RESTREPO, A., McEWEN, J. G., CASTANEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle**. Med. Mycol**., v. 39, p. 233-241, 2001.

REZENDE, T. C. et al. A quantitative view of the morphological phases of Paracoccidioides brasiliensis using proteomics. **J Proteomics**, Sep 2011

REIS B, MARTINS M, BARRETO B, MILHAZES N, GARRIDO EM, SILVA P, GARRIDO J, BORGES F. Structure-property-activity relationship of phenolic acids and derivatives. Protocatechuic acid alkyl esters. **J Agric Food Chem.** V.9, n.58(11), p.6986-93, 2010 Jun

RIBEIRO, L. C. Systemic mycosis: factors associated with death among patients infected with the human immunodeficiency virus, Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil, 2005-2008]. **Rev Soc Bras Med Trop,** v. 42, n. 6, p. 698-705, 2009.

RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ G, DUTHIE GG, WOOD S, MORRICE P, NICOL F, REID M, CANTLAY LL, KELDER T, HORGAN GW, FERNÁNDEZ-BOLAÑOS GUZMÁN J, DE ROOS B. Alperujo extract, hydroxytyrosol, and 3,4-dihydroxyphenylglycol are bioavailable and have antioxidant properties in vitamin E-deficient rats--a proteomics and network analysis approach. **Mol Nutr Food Res**.;v. 56, n. 7, p. 1137-47, 2012.

SAN-BLAS, G., NINO-VEJA, G., ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med. Mycol**., v. 40, p. 225-242, 2002.

SANGALLI-LEITE F, SCORZONI L, MESA-ARANGO AC, CASAS C, HERRERO E, SOARES MENDES GIANINNI MJ, RODRIGUEZ-TUDELA JL, CUENCA-ESTRELLA M, ZARAGOZA O: "Amphotericin B mediates killing in Cryptococcus neoformans through the induction of a strong oxidative burst". **Microbes Infect,** vol. 13, no. 5, pp. 457-67, 2011.

SANTOS, G. D., Oenothein B inhibits the expression of PbFKS1 transcript and induces morphological changes in Paracoccidioides brasiliensis. **Med Mycol,** v. 45, n. 7, p. 609-18, 2007.

SANFRUTOS, J.M.; JARAMILLO F.J.L; MATEO F.H; GONZALEZ, F.S. J. **Org. Chem**. n. 75, p. 4039 e 4047, 2010.

SARDI JCO, ALMEIDA AMF, MENDES GIANNINI MJS. "New antimicrobial therapies used against fungi present in subgingival sites—a brief review". **Archives of Oral Biology**, vol. 56 , no 10, pp. 951–959, 2011.

SCORZONI, L. et al. The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcis* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**. 38: 391-397 p. 2007.

SCORZONI, L, "Estudo da atividade antifúngica e perfil de expressão de proteínas em leveduras do gênero *Candida* após tratamento com extratos de *Kielmeyera rubriflora*" *(*Dissertação em Biociências e Biotecnologia aplicada a Farmacia Faculdade de Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas- Araraquara, 2008.

SHIKANAI-YASUDA MA PK, OSHIRO TM, DIOGO CL, PASSOS EC,. Characterization of monocyte-derived dendritic cells from patients with active and treated paracoccidioidomycosis. Scand **J Immunol.** V. 74, n.6, p. 609-18, 2011.

SINICO, C.; DE LOGU, A.; LAI, F.; VALENTI, D.; MANCONI, M.; LOY, G.; BONSIGNORE, L.; FADDA, A. M. Liposomal incorporation of *Artemisia arborescens* L. essential oil and *in vitro* antiviral activity. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 59, n. 1, p. 161-168, 2005.

SHIKANAI-YASUDA, M. A., TELLES FILHO, F. Q., MENDES, R. P., COLOMBO, A. L., MORETTI, M. L. Guidelines in paracoccidioidomycosis. Rev. Soc. Brás. **Med. Trop**., v. 39, p.297-310, 2006.

SIMOES, C. M. O. **Farmacognosia da planta ao medicamento. p.** 577 – 609, 2006.

SILVA, J. D. F. D. "Clonagem e caracterização da proteína 14-3-3 de Paracoccidioidesbrasiliensis durante sua interação com células epiteliais**"**. 132 (Doutorado). Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP, Araraquara, Brasil. 2011.

SILVA, M. F. et al. Phenotypic and functional characterization of pulmonary macrophages subpopulations after intratracheal injection of Paracoccidioides brasiliensis cell wall components. **Immunobiology,** v. 216, n. 7, p. 821-31, Jul 2011.

SIMOES, C. M. O. **Farmacognosia da planta ao medicamento. p.** 577 – 609, 2006.

SINGH NP, LAKSHMINARASIMHAN P, KARTHIKEYAN S, PRASANNA PV. Flora of Maharashtra state – dicotyledons (flora of India series 2). Culcatta: The Director, **Botanical Survey of India.** p. 894, 2001.

SNEDDEN WA AND FROMM H Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants. **New Phytol**. n. 151, p. 35–66, 2001.

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

SOKOL-ANDERSON ML, BRAJTBURG J, MEDOFF G. Sensitivity of Candida albicans to amphotericin B administered as single or fractionated doses. **Antimicrob Agents Chemother**. V. 29, n. 4, p.701-2. 1986.

SOLANS C., J. ESQUENA, A. FORGIARINI, D. MORALES, N. USO´N, P. IZQUIERDO, et al., Nanoemulsions: formation and properties, in: D. Shah, B. Moudgil, K.L. Mittal (Eds.), Surfactants in solution: fundamentals and applications, Surfactant Science Series**, Marcel Dekker**, New York, p. 525– 554. 2002.

SONNEVILLE-AUBRUN O., SIMONNET J.T., L'ALLORET F., Nanoemulsions a new vehicle for skincare products, Adv. **Colloid Interface Sci**. v. 108, n. 109,p. 145–149, 2004.

SOUZA MA, JOHANN S, LIMA LA, CAMPOS FF, MENDES IC, BERALDO H, DE SOUZA-FAGUNDES EM, CISALPINO PS, ROSA CA, ALVES TM, DE SÁ NP, ZANI CL. The antimicrobial activity of lapachol and its thiosemicarbazone and semicarbazone derivatives. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** n. 108, p. 3, 2013.

SPEICHER, D. W. Overview of proteome analysis. In: SPEICHER, D. W. (Ed.). **Proteome Analysis: Interpreting the Genome**. The Netherlands: Elsevier, 2004.

SPYCHALA J, DATTA NS, TAKABAYASHI K, DATTA M, FOX IH, GRIBBIN T, MITCHELL BS. Cloning of human adenosine kinase cDNA: sequence similarity to microbial ribokinases and fructokinases**. Proc Natl Acad Sci** U S A. v. 6; n. 93(3)p. 1232-7, 1996.

STARHEIM, K.K.; GROMYKO D, EVJENTH R, RYNINGEN A, VARHAUG JE, et al Knockdown of human N alpha-terminal acetyltransferase complex C leads to p53-dependent apoptosis and aberrant human Arl8b localization. **Mol Cell Biol** n. 29, p. 3569–3581, 2009.

STIDDER, B.; FRAGNETO, G.; ROSER, S.J. Effect of low amounts of cholesterol on the swelling behavior of floating bilayers. ***Lang***., v.21, p.9187 – 9193, 2005.

STUDIER, F. W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. **J Mol Biol,** v. 79, n. 2, p. 237-48, 1973

SOLANS, J. C ESQUENA, A. FORGIARINI, D. MORALES, N. USO´N, P IZQUIERDO, ET AL., NANOEMULSIONS: FORMATION AND PROPERTIES, IN: D. SHAH, B. MOUDGIL, K.L. MITTAL (EDS.), Surfactants in solution: fundamentals and applications, **Surfactant Science Series, Marcel Dekker**, New York, pp. 525–554, 2002.

STOJKOVIĆ DS, ZIVKOVIĆ J, SOKOVIĆ M, GLAMOČLIJA J, FERREIRA IC, JANKOVIĆ T MAKSIMOVIĆ Z. Antibacterial activity of Veronica montana L. extract and ofprotocatechuic acid incorporated in a food system. **Food Chem Toxicol**. n 55, p. 209-13. 2013.

SUDBERY, P., A.R. GOODEY, AND B.L.A. Carter. 1980. Genes which control cell proliferation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae.* **Nature** 288: 401-404.

SULTANA, N.; CHOUDHARY, M. I.; KHAN, A. Protein glycation inhibitory activities of Lawsonia inermis and its active principles. **J Enzyme Inhib Med Chem,** v. 24, n. 1, p. 257-61, 2009.

SULLIVAN MM, SAGE EH. Hevin/SC1, a matricellular glycoprotein and potential tumor-suppressor of the SPARC/BM-40/Osteonectin family. **Int J Biochem Cell Biol**.;v. 36, n. 6, p. 991-6. 2004 .

SUTCLIFFE, J., D. BIEDENBACH, R. JONES, AND T. FRITSCHE**.** Novel nanoemulsion antimicrobials tested against nine gram-positive species, abstr. F1- 3944. Abstr. 48th Intersci. Conf. **Antimicrob. Agents Chemother**. 2008.

SU, Y. L.; FU, Z. Y.; ZHANG, J. Y.; WANG, W. M.; WANG, H.; WANG, Y. C. Preparation of Radix salvia nanoparticles. **Powder Technology**, v. 184, p. 114-121, 2008.

SVETAZ, L.; TAPIA, A.; LOAPEZ, S.N.; FURLAAN, R.L.E.; PETENATTI, E.; PIOLI, R.; SCHIMEDA-HIRSCHMANN, G.; ZACCHINO, S.A. Antifungal chalcones and new caffeic acid esters from *Zuccagnia punctata* acting against soybean infecting fungi. **J. Agric. Food Chem**. v.52, 3297-3300, 2004

SWENSON, *K.I.,* K.M. FARRELL, AND J.V. RUDERMAN. The clam embryo protein cyclin A induces entry into M-phase and the resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes. **Cell** *n.* 47, p. 861- 870. 1986.

TAKAHAGI-NAKAIRA, E.; SUGIZAKI, M. F.; PERAÇOLI, M. T. S. Microdilution produce for antifungal susceptibility testing of *Paracoccidioides brasiliensis* to amphotericin B and itraconazole**. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.** 15**:** 719 p. 2009.

TANAKA, S. AND HOSAKA, K. J. **Biochem**. (Tokyo) n. 115, p. 981–984, 1994. TASKOVA, R.M., KOKUBIN, T., RYAN, K.G., GAMOCK-JONES, P.J., JENSEN, S.R., Phenylethanoid and iridoid glycosides in the New Zealand Snow Hebes (Veronica, Plantaginaceae). **Chem. Pharm. Bul**l. n. 58, 703–711. 2010.

TAVARES, L. C., Quinolinyl and quinolinyl N-oxide chalcones: Synthesis, antifungal and cytotoxic activities**.** . **European Journal Med. Chemistry**. 46 4448 - 4456 p. 2011.

TEIXEIRA, M. M., Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the Paracoccidioides genus. **Mol Phylogenet Evol,** v. 52, n. 2, p. 273-83, Aug 2009.

TENJARLA S. Microemulsions: An overview and pharmaceutical applications. Crit Rev Ther Drug.v. 16, n. 5, p. 461-521. 1999.

TOBAL, T. M. et al. Evaluation of the use of Syzygium cumini fruit extract as an antioxidant additive in orange juice and its sensorial impact. **Int J Food Sci Nutr,** v. 63, n. 3, p. 273-7, 2012.

TRAVASSOS LR, RODRIGUES EG, IWAI LK, TABORDA CP. Attempts at a peptide vaccineagainst paracoccidioidomycosis, adjuvant to chemotherapy. **Mycopathologia.** N. 4-5, p.341-52.2008.

UNTEREINER, W.A., SCOTT, J.A., NAVEAU, F.A., SIGLER, L., BACHEWICH, J., ANGUS, A. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. **Mycology** 96, 812–861. 2004.

UGARKAR BG, CASTELLINO AJ, DARE JS, RAMIREZ-WEINHOUSE M, KOPCHO JJ, ROSENGREN S, ERION MD. Adenosine kinase inhibitors. 3. Synthesis, SAR, and antiinflammatory activity of a series of l-lyxofuranosyl nucleosides. **J Med Chem**. v. 23, n. 46(22), p. 4750-60, 200.

VALLA, A.; VALLA, B.; CARTIER, D.; GUILLOU, R.; LABIA, R.; FLORENT, L.; CHARNEAU, S.; SCHREVEL. J.; POTIER, P. New syntheses and potential antimalarial activities of new retinoid-like chalcones. **Eur. J. Med. Chemistry**, v.41, 142-146, 2006.

VANDAMME, T.F. Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges. **Prog. Retin. Eye Res**., v.21, p.15-34, 2002.

VARGAS, J, VARGAS, R. Paracoccidioidomicosis, **Rev. de Enfermedades Infecciosas y Tropicales**, v. 1, n. 1, p. 49-56, 2009.

VENUGOPAL J, PRABHAKARAN MP, LOW S, CHOON AT, DEEPIKA G, DEV VR, RAMAKRISHNA S. Continuous nanostructures for the controlled release of drugs. **Curr Pharm Des**. v. 15, n. 15, p. 1799-808, 2009.

VERDI LG, BRIGHENTE IMC, PIZZOLATTI MG. Gênero Baccharis (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos The Baccharis genus (Asteraceae): chemical, economic and biological aspects. **Quím Nova**. n. **28** p. 85 – 94, 2005.

VERSTREPEN, K. J.; FINK, G. R. Genetic and epigenetic mechanisms underlying cell-surface variability in protozoa and fungi. **Annu Rev Genet,** v. 43, p. 1-24, 2009.

WANG, L. J.; XIAO, X. H.; **Biol. Pharm. Bull**, n. 31, p. 45, 2008.

WASHBURN, M. P.; WOLTERS, D.; YATES, J. R. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. **Nat Biotechnol,** v. 19, n. 3, p. 242-7, 2001.

WALGREN, J. L.; THOMPSON, D. C. Application of proteomic technologies in the drug development process. **Toxicol Lett,** v. 149, n. 1-3, p. 377-85, 2004.

WALKER, M. J., J. D. MCARTHUR, F. MCKAY, AND M. RANSON. Is plasminogen deployed as a *Streptococcus pyogenes* virulence factor. **Trends Microbiol**. n. 13, p. 308–313, 2005.

WANSI, J. D. et al. Antimicrobial and antioxidant effects of phenolic constituents from Klainedoxa gabonensis. **Pharm Biol,** v. 48, n. 10, p. 1124-9, 2010.

WESTERMEIER, R.; LOYLAND, S.; ASBURY, R. Proteomics technology. **J. Clin. Ligand. Assay**. 25**:** 1-11 p. 2002.

WILKINS, M. R. et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Biotechnology (N Y),** v. 14, n. 1, p. 61-5, 1996

WILKINS, M. R, SANCHEZ Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnol Genet Eng Rev,** v. 13, p. 19-50, 1996.

WITTENBERG, C., K. SUGIMOTO, AND S.I. REED. Gl-specific cyclins of *S. cerevisiae:* Cell cycle periodicity, regulation by mating pheromone, and association with the p34 cDc28 protein kinase**.** *Cell* n. 62, p. 225-237, 1990.

WOODS, D. F. & BRYANT, P. J. The discs-large tumor suppressor gene of Drosophila encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions. **Cell**, n. 66, p. 451-464, 1991.

XIMENES, V. F.; LOPES,M. G.; PETRÔNIO, M. S.; REGASINI, L. O.; SILVA, D. H.; FONSECA, L. M.; J "Inhibitory effect of gallic acid and its esters on 2,2'-azobis(2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH)- induced hemolysis and depletion of intracellular glutathione in erythrocytes". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Vol. 58, pp. 5355- 5362. 2010

XINGI, E., SMIRLIS, D., MYRIANTHOPOULOS, V., MAGIATIS, P., GRANT, K. M., MEIJER, L., MIKROS, E., SKALTSOUNIS, A.-L. AND SOTERIADOU, K. 6-Br-5methylindirubin-3′oxime (5-Me-6-BIO) targeting the leishmanial glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) short form affects cell-cycle progression and induces apoptosis-like death: exploitation of GSK-3 for treating leishmaniasis. **International Journal for Parasitology** n. 39, p. 1289–1303,. 2009.

YAN S, RODRIGUES RG, CAHN-HIDALGO D, WALSH TJ & ROBERTS DD Hemoglobin induces binding of several extracellular matrix proteins to Candida albicans. Identification of a common receptor for fibronectin, fibrinogen, and laminin. **J Biol Chem.** n. 6, p. 5638–5644, 1998.

YANG, H.M.; SHIN, H.R.; CHO, S.H.; BANG, S.C.; SONG, G.H.; JU, J.H.; KIM, M.K.; LEE, S.H.; RYU, J.C.; KIM, Y.; JUNG, S.H. Structural requirement of chalcones for the inhibitory activity of interleukin-5. **Bioorganic & Medicinal Chemistry,** 15, 104-111, 2007

YANG, Z. G., Inhibitory effects of constituents from Euphorbia lunulata on differentiation of 3T3-L1 cells and nitric oxide production in RAW264.7 cells. **Molecules,** v. 16, n. 10, p. 8305-18, 2011.

ZAMBUZZI-CARVALHO PF, CRUZ AH, SANTOS-SILVA LK, GOES AM, SOARES CM, PEREIRA M. The malate synthase of Paracoccidioides brasiliensis Pb01 is required in the glyoxylate cycle and in the allantoin degradation pathway. **Med Mycol**.v. 47, n. 7, p. 734-44, 2009.

Capitulo 2

NANOSTRUCTURED LIPID SYSTEMS AS A STRATEGY TO IMPROVE THE *IN VITRO* ANTI-*PARACOCCIDIOIDES* SPP. ACTIVITY OF PROTOTYPE OF ALKYL PROTOCATECHUATES

Alarcón, KPM [1]; Sardi, JCO [1]; Voltan, AR[1]; Petrônio, MS [2]; Souza, PF [2] ; Regasini, LO [2]; Bolzani, VS [2]; Silva, DHS [2];Chorilli[3], M; Mendes-Giannini, MJS[1]; Fusco-Almeida, AM[1].

[1]Department of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University - UNESP, Rodovia Araraquara-Jaú, km 1, 14801-902, Araraquara, SP, Brazil.

[2] Institute of Chemistry, UNESP, Rua Professor Francisco Degni 55, 14800-900 Araraquara, SP, Brazil.

[3] Departament of Drugs and Pharmaceuticals, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University - UNESP, Rodovia Araraquara-Jaú, km 1, 14801-902, Araraquara, SP, Brazil.

Correspondence to:

Dr. Ana Marisa Fusco Almeida, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Araraquara, Department of Clinical Analysis, Laboratory of Clinical Mycology, Univ Estadual Paulista (UNESP),

Tel: +55 – 16 – 3301 – 5717

Fax: +55 – 16 – 3301 - 5717

e-mail: ana.marisa@uol.com.br

Running Title: Antifungal activity of alkyl protocatechuates.

Abstract

Paracoccidioidomycosis is a fungal infection of high relevance that affects a large percentage of the rural population in Latin America and 80 % in Brazil, is caused by a dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. It can be used in various antifungal agents in the treatment of diseases such as amphotericin B, azoles (itraconazole) and sulfamidic in general, and its use is prolonged toxic to the patient. There are reports of treatment failure for these reasons that we evaluate the spectrum of antifungal activity against *Paracoccidioides* spp used for this six esters of protocatechuic acids, including hexyl, heptyl, octyl, nonyl, decyl and dodecyl protocatechuates, and their cytotoxicity in strain MRC5 (normal pneumocyte cells). Nanostructured lipid systems may potentiate the action of compounds, improving aqueous solubility, reducing the required dose and improving the antifungal effect. The aim of this study was to evaluate nanostructured lipid systems as a strategy to improve the in vitro anti-*Paracoccidioides* spp. activity of prototype of alkyl protocatechuates. The anti-*Paracoccidioides* spp. activity of the prototypes incorporated or not into nanostructured systems (comprising 10% oil phase - cholesterol, 10% surfactant [polyoxyethylene 20-cetyl ether - Brij58®, soya phosphatidylcholine] and 80% aqueous phase - phosphate buffer pH 7.4) was evaluated. The results showed MIC values potent protocatechuic acid ester derivative ranging from 0.24 µg / ml and 7.8 µg / ml , all compounds showed high and IC_{50} (SI) over 5 was the best result for the dodecyl reaching the maximum safety and cell viability was 98 % by its poor solubility seen in dedecyl requirement to incorporate a nanocarrier and found the same antifungal activity and observed that showed an MIC of 0.0305 µg / mL and 32 more times more potent , with a cell viability of 99% and an SI 16 times higher when compared to the so dodecyl thus observed a greater excelent antifungal activity when incorporated in this nanostructure system and a high SI which makes it even safer for such reason we found the mechanism of action as dodecyl and even incorporated into the nanostructured system (NS + dodecyl) inhibit the adhesion of the fungus in the matrices fibronectin and laminin , to host the results were that the dodecyl and NS + dodecyl inhibited adhesion de 64 % and 81% for fibronectin matrix and 75 % and 82.4 % respectively for the laminin matrix. The results of this study indicate the potential use of protocatechuic acid therapy incorporated in nanostructured lipid system, in particular the SN + dodecyl and dodecyl would be excellent antifungal prototype to the treatment of paracoccidioidomycosis who presented a strong antifungal activity against the fungi studied, and no cytotoxicity in antifungals may become promising.
Keywords: protocatechuic acid, nanoemulsion, *Paracoccidioides* sp., antifungal, cytotoxicity

1- Introduction:

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a disease caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, which one of the most important systemic mycoses in Latin America, affects many countries, especially Brazil where the largest number of cases have been reported [1,2]. In Brazil because the reporting of paracoccidioidomycosis is not compulsory, it is difficult to determine accurately the number of people affected by the disease [3]. Human infection by *P. brasiliensis* occurs mainly through the respiratory system via inhalation of spores of the fungi mycelial form. The conidia are transformed in yeast through the increase of temperature. The disease may develop after infection or even years later [4]. Probably depends on the relationship between fungal virulence and ability to interact and invade the surface structure of the cell and also related to the host's immune response (Mende Giannini et al., 2004). In regard to virulence, the data indicate that composition of the fungus wall is a likely factor. The virulence factors can be distributed in two categories: those that promote colonization and invasion and that cause harm to the host, such as toxins and proteinase. The adherence of microorganisms to host tissues is an event critical in the development of infection and is connected to the first and major step in colonization by pathogenic microorganisms. (Mendes Giannini et al., 2006). Adherence means that recognizes the pathogen ligands on the surface of the host or constituent of basement membrane, such as fibrinogen, laminin, collagen or fibronectin. The matrix components are intimately associated with the surface of the host cell tissues. There two main types of array: interstice and basement membrane. The laminin is found mainly in the basement membrane subendothelial as fibronectin and various types of collagen are present in the interstitium, particularly as part of fibers lattice (Liakra et al., 1992, Mendes Giannini et al., 2004). These fibers are involved in the accession process fungi, parasites and bacteria as target molecules.

The therapy used in PCM included use of amphotericin B as the first drug of choice for this and other endemic mycoses that bring risk of death, regardless of the immune status of the patient. Their high toxicity difficult therapy. conventional or lipid formulations of amphotericin B are indicated to treat severe disseminated cases in patients who are intolerant of other agents or have refractory infections. Regardless of

its toxicity, the rate of relapse associated with amphotericin B is generally higher than that associated with itraconazole (20%–30% of cases). However, there are cases reports of treatment failure with this drug in lipid formulation [13]. Itraconazole and Ketoconazole are effective for mycoses classified as moderate [14], however, sometimes a secondary prophylaxis lifelong are needed especially in AIDS patients with high levels relapse. In these cases the main medications are the association of trimetoprim sulfametoxazole co trimoxazole, Itraconazole, Cetoconazole and Fluconazole. The increase in antifungal resistance and populations of patients at risk, in conjunction with the restricted number of commercially available antifungal drugs that still present many side effects, means that we have the need to seek new alternatives through the pursuit of antifungal substances from natural origin. Especially for this mycosis in which there are few reports of resistance to antifungals, but there fault data in several therapeutic regimens.

Protocatechuic acid (or 3,4-dihydroxybenzoic acid, figure 1), is a derivative of benzoic acid found in fruits, nuts and vegetables (eg, olives, rice, tea, white wine and herbal medicines). The presence of phenolic compounds has been widely studied due to its pharmacological activities and also to inhibit lipid oxidation and proliferation of fungi. Studies with animals have shown that protocatechuic acid is an effective anticarginogênico with antioxidant properties and protects against oxidative stress exerts preventive effects on cardiovascular diseases that are associated with free radicals [16]. Clearly the need for new antifungal molecules and natural products of great importance in the development of new therapeutic tools.

Considering the chemical complexity of prototypes is extremely important to their incorporation in a vehicle allowing release the active ingredient. Vehicles must concurrently improve the solubility of the drug, minimize the degradation process, reduce any toxicity, and mask any bad taste, while controlling the active absorption and biological response.

Technological strategies, like nanostructured lipid systems, that have the ability to compartmentalize, efficiently, several groups of active and modify Their properties and behavior in a biological environment, are promising for placement of prototypes.The strategy of incorporating plant extracts in nanostructured systems have been widely cited in the literature. Kesarwani and Gupta 2013 published a review article in which mention a series of studies employing nanostructured systems optimize the properties of plant extracts. Bhatacharya and Ghosh 2009 used lipid-based systems for

incorporation of green tea extract and ginseng, with the goal of increasing the absorption of the components extract. Su et al., 2008 have developed nanoparticles of Radix salvia and observed improves the bioavailability of the extract. Sinico et al. 2005 developed liposomes *Artemisia arborescens* and noted that these systems have provided increased penetration components of this plant in the cytoplasmic viral barrier. (Rajendran et al., 2013) nanoparticles obtained from methanol extract of *Ocimum sanctum* and reported better antimicrobial action for the extract encapsulated than in free form when tested against *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, Studies have shown activity against, dermatophytes and *C. albicans* (J. Pannu et al., 2009)

The objective was to investigate the effects of nanostructured lipid systems as a strategy to improve the *in vitro* anti-*paracoccidioides* spp. activity of prototype of alkyl protocatechuates

2 – Methods

2.1. Preparation of nanostructured system

For the development of nanostructured lipid system systems will be used based on the work Formariz et al methodology (2007, 2008, 2010), with adaptations. For a transparent bottle with lid were transferred suitable amounts of nonionic surfactant castor oil polyoxyl -40- hydrogenated () to (8) 4 soy phosphatidylcholine (FS) to (6) 3 and sodium oleate (OS) , (3) 1.5, in a total of 10% of the formulation. Was added to the flasks 10 % cholesterol (oil phas), and then titrated with 80% 0.01 M phosphate buffer , pH 7.4 (aqueous phase) with vortex agitation alternating with rest .

The mixture was sonicated using Sonicator, Sonics ®, Vibra-Cell with a power of 220 watts, operating in a batch mode for 30 min at room temperature with the following parameters: Amplitude 21 ~ 22 %, and 15 minutes for another 15 minutes and the mixture for incorporation , pulse 59 seconds on, 30 seconds off formulations were prepared in triplicate.

Then, they were separately incorporated dodecyl protocatechuic acid and protocatechuic 1.9 µg / mL. The formulations were sterilized with a 0.22 micron filter (Millipore). All materials used to prepare the micro-emulsion were sterilized in an autoclave.

2.2. Characterization phisicochemical of nanoparticles

2.2.1. Determination of the average diameter and polydispersity(PDI)

The average diameter and polydispersity of the nanoemulsion and substances incorporated into the same dispersion were determined using the technique of dynamic light scattering with a wavelength of 633 nm at 25ºC and at 90ºC, all samples were diluted with water purified samples were measured in triplicate with 10 measurements per sample.

The samples were analyzed by Zetasizer Nano particle analyzer-ZS, Malvern Instruments coupled to a multi purpose titrator. (CSABA,KOPI, HOGGARD; ALONSO 2010).

2.2.2. Determination of the Zeta Potential of Nanoparticles

The zeta potential of the nanoparticles were determined by measuring electrophoretic motility was performed by Zetasizer Nano particle analyzer-ZS, Malvern Instruments coupled to a multi purpose titrator.

The measurement is based on the Doppler effect where the frequency change suffered by scattered light from a particle in motion, allows photon counting and preparation of a frequency spectrum from which the zeta potential of the particle can be calculated by calculating the mean values and the calculation of mean values and standard deviation of their (CSABA, KOPI, HOGGARD; ALONSO 2010).

2.2.3. Field emission scanning electron microscopy

The samples were prepared in purified water previously diluted with a 1:10 dilution and were placed on a suitable substrate for reading photomicrographs of samples SN + dodecyl panoramic vision, isolated nanoparticles with and without measuring the diameter of the particle, of an Increase 40X and 170,000 was used field emission scanning electron microscope (SEM-FEG), model JEOL JSM-7500F.

2.3. Compounds

The synthetic protocatechuic acid compounds were prepared as described previously with minor modifications [17,18]. Three milliliter of N, N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 1.0 mmol) in dry p-dioxane was added to a cooled (5°C) of 0.2 mmol of protocatechuic acid and 20 mmol of n-alkyl in 6.0 mL of dry p-dioxane. After 48 h, the solvent was removed under reduced pressure. The residue was partitioned 3 times with ethyl acetate (EtOAc) and

filtered. The filtrate was washed successively with a saturated aqueous citric acid solution (3 times) and saturated aqueous NaHCO3 (3 times), dried over anhydrous MgSO4, and evaporated under reduced pressure. The crude products were purified over a silica gel column eluted isocratically with CHCl3/MeOH (98:2) to give esters. Their structures were established by 1H and 13C NMR spectral analyzes [19, 20].

2.4. Microorganisms.

ATCC strain and clinical isolates belong to the mycology collection of the Laboratory of Clinical Mycology, Department of Clinical Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences, UNESP, Araraquara, were used in the current study. *P. brasiliensis* S1, isolated 18 (Pb18-chronic PCM / São Paulo), *P. lutzii*, Pb01 - strain ATCC MYA-826 (both arising from cases of paracoccidioidomycosis), and S2 (02 - chronic PCM / Venezuela). All strains used were maintained in medium Fava-Netto agar at 37 ° C.

2.5. Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

All microorganisms were tested for drug susceptibility specific commercials. The assay for yeast was performed according to the method described microdilution according to M27-S3 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2008) with modifications. The compounds of Synthetic protocatechuic acid were prepared as described previously with minor modifications (hexyl, heptyl, octyl, nonyl, decyl and dodecyl), were prepared as described by [21]. Antifungal drugs were diluted according to CLSI M27-S3. The inoculates were prepared in RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) with L-glutamine, without sodium bicarbonate, supplemented with 2% glucose, buffered to pH 7.0 using 0.165M MOPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The yeast suspension was adjusted to a final concentration of $5x10^2$, $5x10^3$ cells/mL in RPMI-1640 medium. In 96 well plates, substances were added in serial dilutions, starting from a concentration of 250 µg / mL to 0.24µg / L. The plates were incubated on a shaker at 37°C/ 150rpm for a specific time determined for each microorganism. The reading of MIC (Minimum Inhibitory Concentration) and MFC (Minimum Fungicide Concentration) was performed by spectrophotometry at 490nm and confirmed using Alamar Blue (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) reading was detected visually by the change in original blue color reagent to pink, confirming the death or growth inhibition provided by the anti-fungal substances. All tests were performed in triplicate control.

2.6. Confirmatory analysis of morphological sensitivity test to Pb18

The plate sensitivity was assembled according to the microdilution susceptibility assay as described above, so that after 72 to 96 h incubation, the plate was analyzed in the INCell Analyzer 2000 (GE Healthcare), with the objective of 20 times for preliminary observation of morphological changes in the isolated contact with antifungals.

2.7. Cell cytotoxicity assay (Sulforhodamine B Test)

The cytotoxicity of protocatechuates was assessed by Sulforhodamine B 0.1% for cells lines NOK (keratinocyte oral mucosa), A549 (human pneumocytes cancer cells) and MRC5(human normal pneumocyte cells) obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). The plates are incubated with the cells containing 2.5 x 10^3 to 5 x 10^4 cells per well at 36.5 ° C with 5% CO_2 for 24 hours to form the cell monolayer [22], Compounds were tested at different concentrations of 62.5 μg/mL to 0.12 μg/mL were made using serial dilutions 100μL per well, positive control was accomplished with hydrogen peroxide after being incubated for 24 h and revelation was obtained by method Sulforhodamine B 0.1%, the absorbance was measured by ELISA reader (enzyme-linked immunosorbent assay) at 570 nm. Finally cell viability was calculated at concentrations close to MIC, thereby assays were performed in triplicate [23].

2.8. Adhesion of *P. brasiliensis* to artificial extracellular matrix

First, 24-well plates were coated with extracellular matrix (ECM), fibronectin and laminin (Sigma) at a concentration of 50 ug / ml for 18 h / 4°C and 1 h at room temperature. After this period, the plates were washed three times with PBS. For the reactions fungal suspensions of 10^3 CFU / mL, which was inoculated with the ECM sensitized plate and incubated at 37°C for 1 to 3 h, respectively was used. Subsequently, the supernatant was removed and the plate was washed with PBS and 300 μL were added trypsin (Sigma). The supernatant obtained was then centrifuged and discarded, and each tube was added 500 ul FACS for later cell count by flow cytometry (BD FACSCanto) with the aid of BDFACS Diva software. Three independent experiments were performed.

2.9. Assay of inhibition of adhesion of *P. brasiliensis* to artificial extracellular matrix

After the period of adhesion described above, the treatment with the substance selected (dodecyl) and dodecyl incorporated into the nanoemulsion for 24 h at 37°C was performed, the medium used was RPMI -1640 L - glutamine and without sodium bicarbonate 2% glucose to maintain adequate nutritional status of the compliance. Subsequently, the supernatant was removed and the plate was washed with PBS and 300 µL were added trypsin (Sigma).The supernatant obtained was then centrifuged and discarded, and each tube was added 500 ul FACS for later cell count by flow cytometry (BD FACSCanto) with the aid of BDFACS Diva software. Three independent experiments were performed.

3. Results:

3.1. Characterization phisicochemical of nanoparticles:

3.1.1 Determination of the average diameter and polydispersity(PDI)

Characterization of the diameter and the index values was observed in Tabela 01e Fig 01, 02 and 03 with a mean value of 151 nm and 0.19, for SN (Nanoemulsion), SN + dodecyl with a measured value of 148 nm and 0.14 and to SN + amphotericin, 156 nm and 0.13, particle size and polydispersity of the nanoparticles respectively.
The samples were analyzed by Zetasizer Nano particle analyzer-ZS, Malvern Instruments coupled to a multi purpose titrator

S N (Nanoemulsion)		**SN+ dodecyl**		**SN+ amphotericin**	
Diametro ± SD (nm)	PDI± SD	Diametro ± SD (nm)	PDI± SD	Diametro ± SD (nm)	PDI± SD
151,65 ± 0,11	0,17± 0,1	148,70 ± 0,75	0,13± 0,01	156,95±0,35	0,11± 0,04
150,85 ± 0,85	0,11 ± 0,1	146,80± 0,38	0,13± 0,01	155,9 ± 0,70	0,12± 0,01
151,15 ± 0,85	0,19± 0,2	147,95± 0,15	0,14± 0,01	156,8 ± 0,50	0,13± 0,02

Table 01. Evaluation of particle size and polydispersity (PDI) of the nanostructured system (nanoemulsion) for the dodecyl and amphotericin incorporated in the nanostructured system. Standar variation (SD) mean of 10 determinations.

3.2. Determination of the zeta potential of the nanoparticles

The values obtained are observed in table 02 with an average value of -58.3 to SN (Nanoemulsion) SN + dodecyl value measured with a nanoemulsion -68.12 and -59.15 SN + amphotericin zeta potential of the nanoparticles respectively.Samples were measured in triplicate with 10 measurements per sample.The samples were analyzed by Zetasizer Nano particle analyzer-ZS, Malvern Instruments coupled to a multi purpose titrator.

NS(Nanoemulsion)	NS+ dodecila	NS+ amphotericin
Potencial zeta ± SD (nm)	Potencial zeta ± SD (nm)	Potencial zeta ± SD (nm)
58,30 ± 1,04	68,43 ± 1,79	56,70±0,70
55,65 ± 0,95	67,80± 1,90	57,05 ± 0,70
54,54 ± 0,05	68,12± 0,16	59,15± 0,65

Table 02. Evaluation of pontencial zeta of the nanostructured system (nanoemulsion) for the dodecyl and amphotericin incorporated in the nanostructured system. Standar variation (SD) mean of 10 determinations.

3.3. Field emission scanning electron microscopy

Figures 04, 05 and 06, show the photomicrographs of samples SN + dodecyl panoramic vision, isolated nanoparticles with and without measuring the diameter of the particle, an increase of 40X and 170,000 X times, observed in figure respectively, was used field emission scanning electron microscope, model JEOL JSM-7500F.

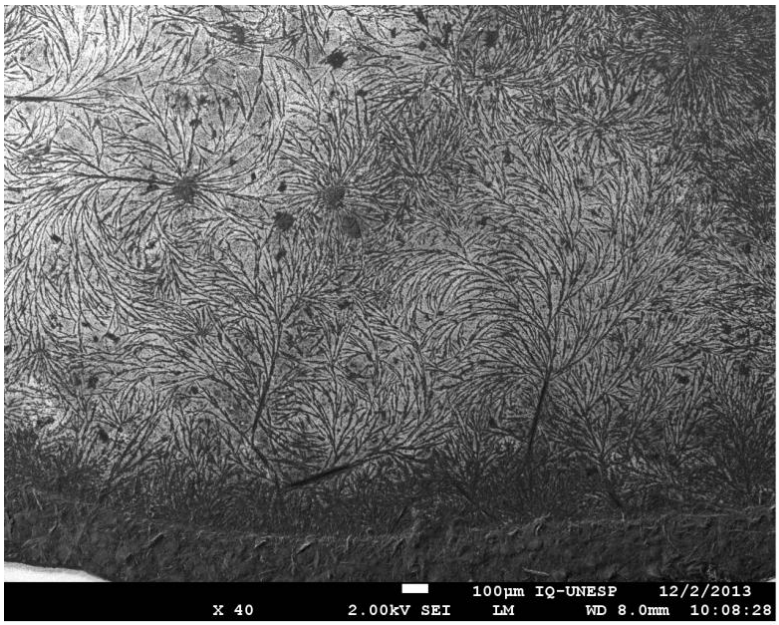


Fig 04. Photomicrograph Field emission scanning electron microscopy of representative of SN + dodecyl x40 increase panoramic vision.

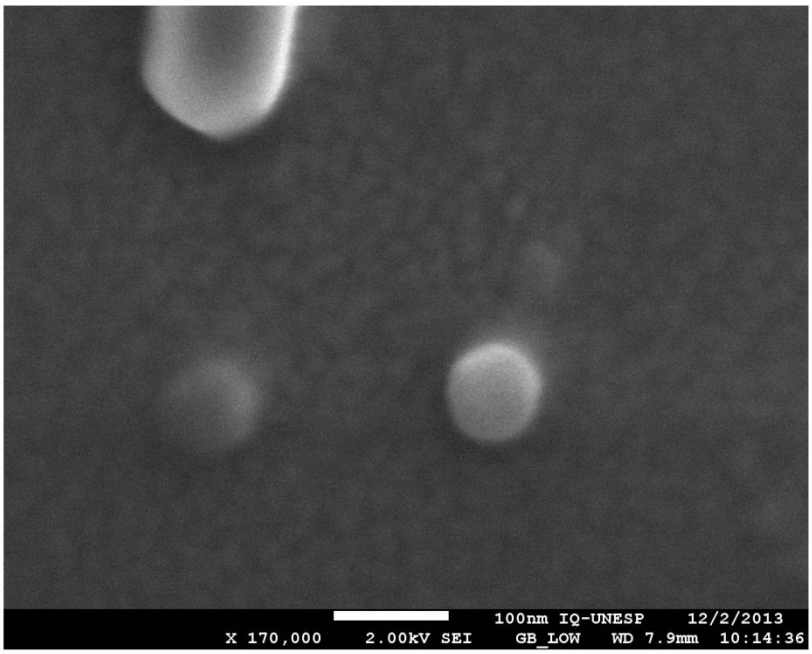


Fig 05. Photomicrograph Field emission scanning electron microscopy of representative isolated nanoparticles of SN + dodecyl, x 170,000.

3.4. Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Present the results of antifungal activity of protocatechuates. All did not esters of protocatechuates (hexyl, Heptyl, octyl, nonyl, decyl and dodecyl) were tested against the phylogenies of *Paracoccidioides sp*. compared to the positive control substances used as standards itraconazole and amphotericin the values of MIC were evidenced using the Alamar Blue, ranging between 0.48 and 7.8 µg/ml. For *P. lutzii* (Pb01) and *P.*

brasiliensis (Pb 18), the variation was 0.48 and 7.8 µg/ml. whereas for *P. brasiliensis* (Pb 02) was 0.24 and 1.9 µg/ml. the results observed in table 03. All acids have potent antifungal action, but the best was the fraction of dodecyl fraction for the three phylogenies due to better selectivity index (SI), especially for strain PB02, showed an index of maximum security, table 04, it presents a good activity, but difficult solubility for such reason we incorporated the dodecyl and anphotericin into of nanocarrier (nanoemulsion) and obtained the following result values MIC vary for three strains of 0.06 to 0.0305 µg/mL increased values of MIC in range 4-32 times the MIC without the incorporation of nanostructured the results observed in the table 05 and 06 respectively.

	hexyl MIC µg/mL (µM)	heptyl MIC µg/mL (µM)	Octyl MIC µg/mL (µM)	nonyl MIC µg/mL (µM)	decyl MIC µg/mL (µM)	dodecyl MIC µg/mL (µM)	amphotericin (standars drugs) MICµg/mL (µM)	itraconazole (standars drugs) MIC µg/mL (µM)
Paracoccidioides brasiliensis (phylogenetic S1, isolated 18 Pb18)	3,9 (16,4)	7,8 (30,9)	0,97 (3,6)	1,9 (6,8)	0,97 (3,3)	0,48 (1,5)	0,125 (0,14)	0,02 (0,03)
Paracoccidioides lutzii (Pb 01 - ATCC MYA-826)	7,8 (32,8)	3,9 (15,5)	0,97 (3,6)	0,97 (3,5)	1,9 (6,4)	0,48 (1,5)	0,06 (0.06)	0,12 (0,17)
Paracoccidioides brasiliensis (phylogenetic S2, isolated 02, Pb02)	1,9 (8,0)	0,24 (1,0)	1,9 (7,1)	0,48 (1,8)	0,48 (1,6)	0,24 (0,7)	0,02 (0,03)	0,008 (0,01)

Table 03. MIC values and quantitative analysis of fungal cell viability of pure fraction protocatechuic acid derivative different, strains of pathogenic paracoccidioidomicosis, and were performed in triplicate independent assays(MIC: minimum inhibitory concentration).

protocatechuic acid derivative	IC50 Complex *Paracoccidoides spp* (µg/mL) (µM)	SI (IC50/CIM) *P. brasiliensis* Pb18)	SI (IC50/CIM) *P. lutzii* (Pb 01)	SI (IC50/CIM) *P.brasiliensis* Pb02
hexyl	29,5	7,5	3,8	15,5
heptyl	17,6	2,3	4,5	73,3
octyl	33,7	34,7	34,7	17,7
nonyl	17,7	9,3	18,2	36,9
decyl	16	16,5	8,4	33,3
dodecyl	17,9	37,3	37,3	74,7
amphotericin	0,22	1,8	1,8	3,7

Table 04 - Valuation of cytotoxic activity in MRC-5 cells and Selectivity Index (SI) from the ratio of the IC50.

Drugs	**dodecyl MIC µg/mL(µM)**	**SN + dodecyl MIC µg/mL (µM)**	**X increase**	**amphotericin (standars drugs) MIC µg/mL (µM)**	**SN +amphotericin MIC µg/mL (µM)**	**X increase**
P.brasiliensis isolated **(Pb18)**	0,48 (1,5)	0,0305 (0,09)	32	0,125 (0,14)	0,015	8.3
P. lutzii (Pb 01 - ATCC MYA-826)	0,48 (1,5)	0,0305 (0,09)	32	0,06 (0.06)	‘0,06	---
P brasiliensis, isolated 02, (Pb02)	0,24 (0,7)	0,06 (0,19)	4	0,12 (0,03)	0,015	8

*IC50: 50% inhibitory concentration. SI: selectivity index obtained from the relationship between the IC50 (MRC-5) by MIC for each fungi.

Table 05. MIC values and quantitative analysis of fungal cell viability of dodecyl and amphoterecin incorporated the same in the nanostructured system, strains of pathogenic paracoccidioidomicosis, and were performed in triplicate independent assays. MIC: minimum inhibitory concentration.

protocatechuic acid derivative	IC50 Complex *Paracoccidoides spp* (µg/mL)	SI (selectivity índex) (CI50/CIM) *P. brasiliensis* Pb18)	SI (IC50/CIM) *P. lutzii* (Pb 01)	SI (IC50/CIM) *P.brasiliensis* Pb02
dodecyl	17,9	37,3	37,3	74,7
dodecyl+SN	17,7	580,3	580,3	295
amphotericin	0,22	1,8	1,8	3,7
Amphotericin +SN	4,06	133	133	67.7

Table 06. Valuation of cytotoxic activity in MRC-5 cells and Selectivity Index (SI) from the ratio of the IC50. MIC: minimum inhibitory concentration IC50: 50% inhibitory concentration. SI: selectivity index obtained from the relationship between the IC50 (MRC-5) by MIC for each fungi, dodecyl +SN (dodecyl within the nanostructured system.

3.5. Confirmatory analysis of morphological sensitivity test to Pb18

The morphological analysis to confirm inhibition of Pb18 to amphotericin (SN + amphotericin) and dodecyl (SN + dodecyl) system incorporated in the nanostructured MIC 0.015 µg / ml and 0.0305 µg / ml, respectively. The analyzes were performed on the IN Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare) with a 20x increase. Negative control (C), no growth of yeast cells, and positive control (C +) with growth.

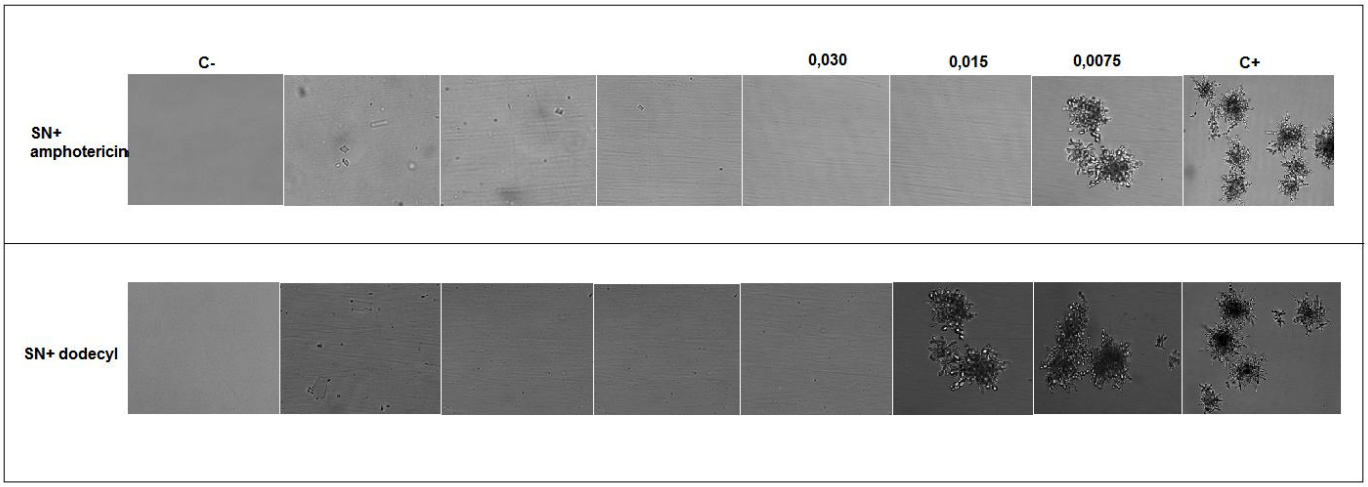


Fig 06. Confirmatory morphological analysis of inhibition by CIM (In Cell Analyser GE) with an increase of 20x, for Pb18. To MIC dodecyl and amphoterecin incorporated in the nanostructured system (SN+ anphotericin) with (0.015 ug/mL) and (SN+ dodecyl) (0.0305 ug/mL), respectively.

.3.6 Cell Cytotoxicity Assay

The cytotoxicity assay showed high cell viability in all fractions tested. There was a variation of cell viability from 91 to 99.4% between fractions studied. The results for the nanostructured system SN (nanoemulsion) demonstrated cell viability of 97%, dodecyl was 98% and dodecyl when the nanoemulsion was incorporated into the cell viability was 99%, when in contact with the MRC5 line (Figure 08).

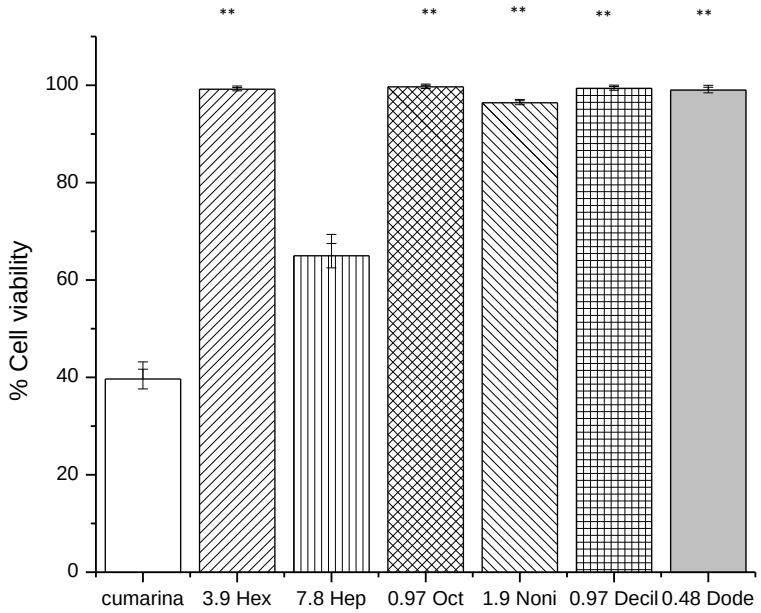


Fig 07. The graph shows the percentage of cell viability of MIC of different Protocatechuic derivative acids in cell line MRC5 (human normal pneumocyte cells) using as positive control cumarin, against *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) in (µg/mL) were performed tests in triplicate. We used the program applied statistician origin 6.0 Test - t ($p<0,01$**), level, the two means are significantly different when compared with the positive control and dodecyl.

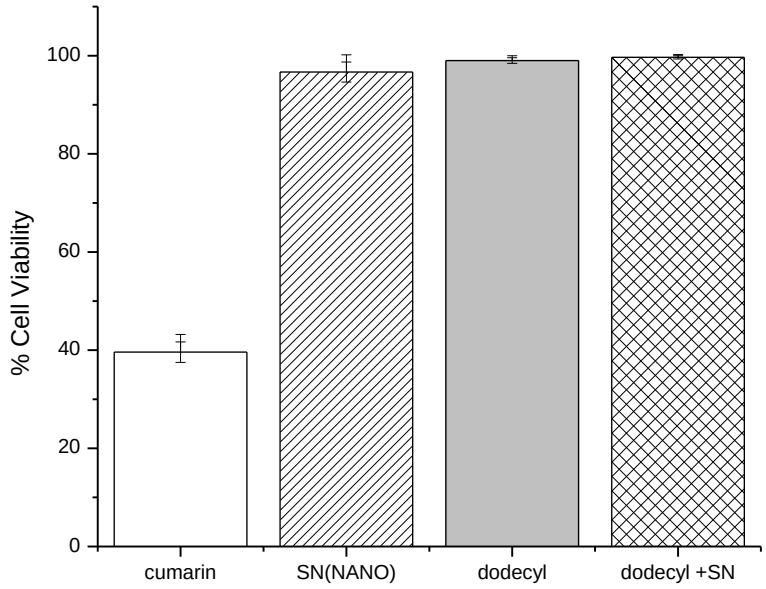


Fig 08. The graph shows the percentage of cell viability of MIC of the nanoemulsion (nanostructured system) (SN(NANO), dodecyl and the nanostructured system with dodecyl (dodecyl + SN) in cell line MRC5 (human normal pneumocyte cells) using as positive control cumarin, were performed tests in triplicate. We used the program applied statistician origin 6.0 Test - t ($p<0,01^{**}$).

3.7. Formation of the curve the adhesion

The adhesion assays of P. brasiliensis (Pb18) to ECM components (fibronectin and laminin) was performed at the time of 1h and 3h and 5h. The period of adhesion of the ECM was better in 3 h. Data were statistical significant at $p < 0.01$ (Figure 11 and 12).

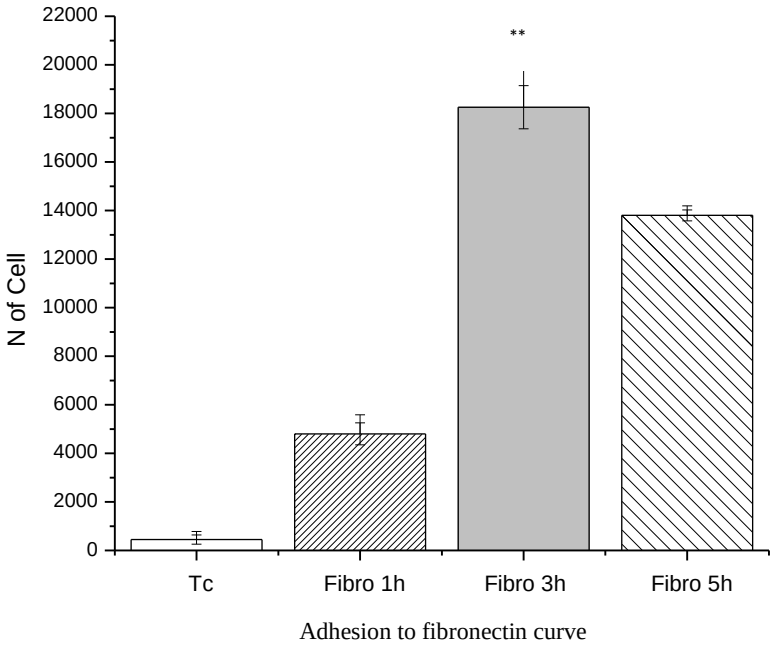


Fig 09. Curve of adhesion of fibronectin matrix in 1h, 3h and 5h results are expressed in number of cells X103, statistical analysis showed that there was significant difference (p> 0.01), the experiments were performed in triplicate.

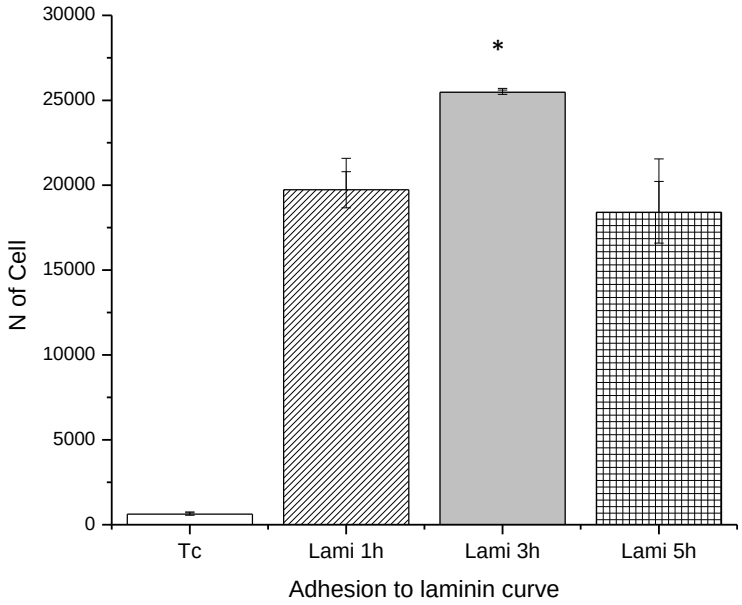


Fig 10. Curve of adhesion of laminin matrix in 1h, 3h and 5h results are expressed in number of cells X103, statistical analysis showed that there was significant difference (p> 0.05), the experiments were performed in triplicate.

3.8. Adhesion inhibition assays

Tests of inhibition of adhesion of P. brasiliensis (Pb18) to ECM components (fibronectin and laminin) adhesion after 3h, and 24h of treatment with the same substance selected and incorporated into the nanostructure (SN-nanoemulsion) in the system established MIC value. The result of the inhibition of adhesion to fibronectin matrix was 64% for and 81% for dodecyl dodecyl + SN-(nanoemulsion) for inhibition of adhesion to laminin, dodecyl was 75% and dodecyl + SN- (nanoemulsion) was 82.4%.

Data were statistically analyzed showing significant difference when compared with the control ($p < 0.001$ ***) for both graphics and between substances ($p < 0.05$ *), when incorporated into the microemulsion found a significant difference between dodecyl and dodecyl + SN -(nanoemulsion)Adhesion inhibition assays to laminin matrix ($p < 0.01$ **)

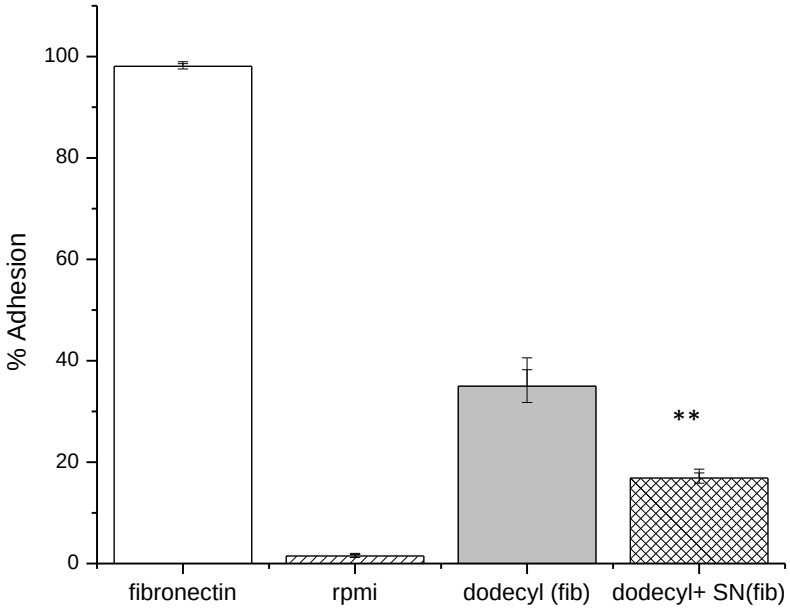


Fig 11. Expresses the inhibition of adhesion of P. brasiliensis (Pb18) expressed as % of protocatechuic acid dodecyl (dodecyl fib) and dodecyl incorporated in the nanostructure system (nanoemulsion) (dodecyl + SN(lam)), in the (minimum inhibitory concentration MIC), adhesion time was 3hr on fibronectin matrix and treatment time of 24hr.The results were expressed in triplicate, ($p > 0.01$), the assays were performed in triplicate.

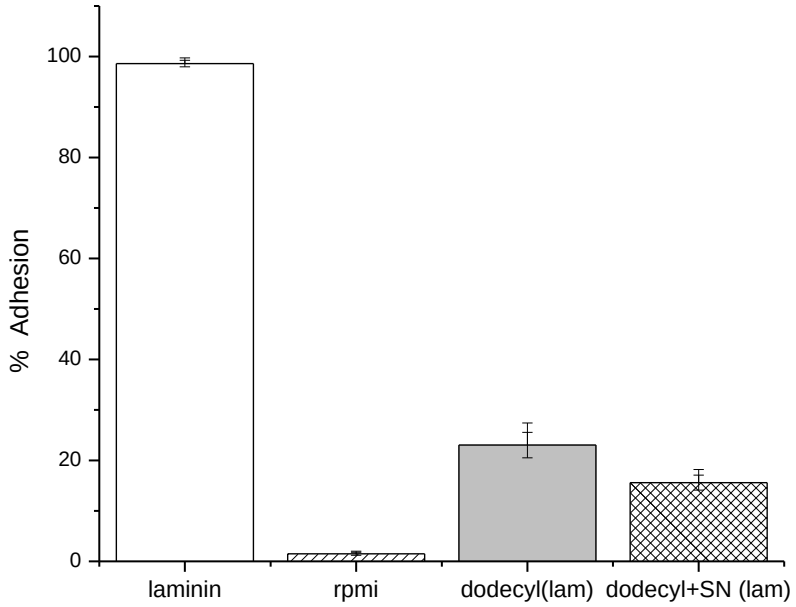


Fig 12. Expresses the inhibition of adhesion of P. brasiliensis (Pb18) expressed as % of protocatechuic acid dodecyl (dodecyl fib) and dodecyl incorporated in the nanostructure system (nanoemulsion) (dodecyl + SN(lam)), in the (minimum inhibitory concentration MIC), adhesion time was 3hr on fibronectin matrix and treatment time of 24hr.The results were expressed in triplicate, the assays were performed in triplicate.

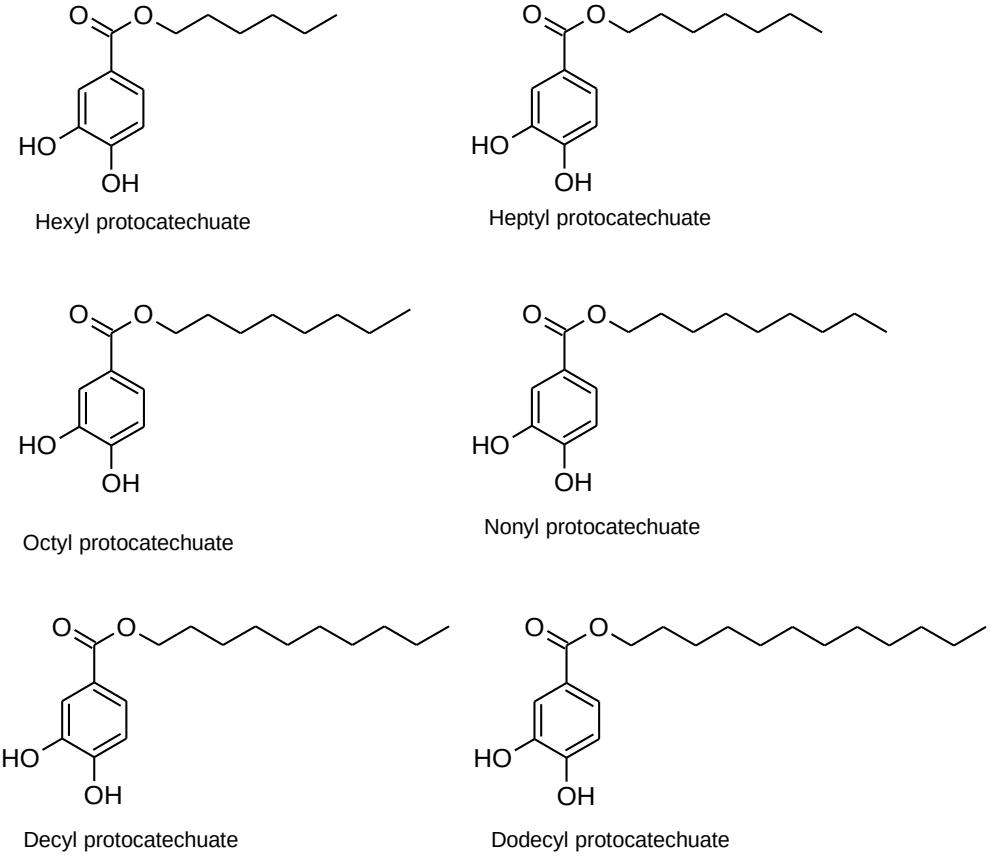


Figure 13. Molecular structures of protocatechuate esters.

4 – Discussion

The paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic disease of great importance in our country , given its high frequency , the severity of some of its forms anatomoclinical and mortality [24 , 25] , limited to Latin America, from Mexico to Argentina , with prevalence in countries of South America [4] . In Brazil 80 % of cases of reported patients had the highest mortality rates occur each year in the Southeast [26]. The treatment against (PCM) can be used for various antifungal agents such as amphotericin B, azoles (itraconazole) and sulfamidic in general , prolonged use and is toxic for the patient studies Amphotericin B (AmpB) have shown to have several limitations , such as its limited solubility and nephrotoxicity. AmpB been described that can also cause cell death through induction of a strong oxidative burst [34]. For this reason, we see a new alternative in natural products such as the most productive sources of new drugs, several reasons have been advanced to explain their research, among them is their chemical diversity [27,28] An ideal antifungal prototype must have broad-spectrum antifungal activity and no toxicity to the host [29]. So we were studying the effect of antifungal protocatechuate acids that are derived from 3,4 - dihydroxybenzoic acid is a derivative of benzoic acid found in fruits and vegetables, there studies that the presence of phenolic compounds refers to the pharmacological activity inhibiting lipid oxidation and fungal growth [30]. The protocatechuic acid (3,4-dihydroxybenzoic acid) is known to have antioxidant, anticancer and cardioprotective activity (Reis et al., 2010). Natural products represent an excellent source of new chemical entities for the search and optimization of antimicrobial compounds (Barret, 2002). A new drug of natural origin is subjected to pharmacological optimizations, through structural modifications (Nussbaum et al., 2006). A series of protocatecuatos was synthesized and tested for their antifungal activity against *Paracoccidioides* sp.

The present study showed that protocatechuates and its fractions (hexyl, hepyl, octyl, nonyl, decyl, and dodecyl) were very effective against *Paracoccidioides brasiliensis* and its phylogenies studied , MIC values ranging from 0.24 to 7.8 μg /mL , and cell viability values ranging from 70 - 98% , with the fraction that showed a more potent antifungal effect in the strains was the fraction dodecyl with MIC values of 0.48 μg /mL , 0.48 μg /mL and 0.24 μg /mL for Pb18 , PB02 , and PB 01 respectively with a cell viability of 98 % and a selectivity index of 37.7, 30 increase higher when compared to the standard antifungal drug amphotericin used for treatment present an IS of 3.7, which makes it an antifungal that cause toxicity in the patient with prolonged use and

that the index of recommended selectivity is above 10. For this reason dodecyl fraction is a substance that becomes highly secure meaning it has a good antifungal effect with almost no toxicity (table 03, 04 and Figure 08). Neihei et al., 2004 evaluated the series of alkyl diidroxibenzoatos (protocatecuatos) and its fungicidal activity against *Saccharomyces cerevisiae*. The nonila protocatecuato and octyl were more effective against this yeast with CFM of at least 12.5 mg / mL. The activity was correlated with the length of the alkyl chain. In our study, the dodecyl this way the molecule was chosen for its high antifungal activity, cell viability and its high selectivity index. Yet the dodecyl possesses poor solubility hampering the viability of the tests, for such reason to incorporate a nanostructured system in order to increase their biological effects and facilitate their manipulation. The nanocarrier dosage forms have a number advantages to natural products formulation [17,18] They help to improve the pharmacokinetic and pharmacodynamic aspect the natural products, including enhancement of solubility , bioavailability , stability , as well as protection from toxicity. Previous reports have emphasized herbal nanocarrier of a single compound in the formulation suchs silimaryn the liposome [18] transferosomes capsaicin [19] and solid lipid nanoparticle curcuminoid [20] for this reason , we found the antifungal effect of dodecyl incorporated into the nanostructured system was observed that initially MIC of 0.48 ug / mL reduced the 0.0305 ug / mL increase in 32 times its antifungal action, with 99 % cell viability and an IS value increased 16 times over the system with the substance in relation only dodecyl (table 6).

Thus, it was observed that the system can satisfactorily transport the substance under study and increase the effects thereof, without the requirement to put a diluent which may cause cytotoxicity and mask an effect that would not exactly substance in the study, so we check the engine of action of the substance and the same would be incorporated into the nanostructured system by inhibiting the adhesion of the fungus to the host. Our results are in agreement with the current literature, where several authors have found benefits with nanocarriers. Raza et al., 2013 studied the antimicrobial activity of isotretinoin (ITR) with and without lipid nanoparticles against Propionibacterium acnes pathogen and the results showed that ITR had marked antimicrobial activity against anaerobic pathogen, P. acnes. ITR loaded nanocarriers with increased antimicrobial activity. Bhatacharya and Ghosh 2009 used lipid-based systems for incorporation of green tea extract and ginseng, with the goal of increasing the absorption of the components extract. Su et al., 2008 have developed nanoparticles

of *Radix salvia* and observed improves the bioavailability of the extract. Sinico et al. 2005 developed liposomes *Artemisia arborescens* and noted that these systems have provided increased penetration components of this plant in the cytoplasmic viral barrier. (Rajendran et al., 2013) nanoparticles obtained from methanol extract of *Ocimum sanctum* and reported better antimicrobial action for the extract encapsulated than in free form when tested against *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, Studies have shown activity against, dermatophytes and *C. albicans* (Pannu et al., 2009).

Pupe et al., 2011, utilized the chlorhexidine nanosystem and obtained a good result against *Streptococcus mutans* and *C. albicans*. Moreover, they observed that the nanosystem formulations present higher stability for all chlorhexidine inclusion complexes compared with pure chlorhexidine. The nystatin nanosystems have the potential to mask the bitter taste, justifying subsequent in-vivo studies.

The ability of *P. brasiliensis* to cause a mycose, with a variety of clinical manifestations of localized and disseminated forms disease can progress to lethality; it probably depends on the relationship between the virulence of the fungus and its ability to interact with the surface of the host structures (Mendes - Giannini et al., 2000). The disease can directly affect the organs, so *P. brasiliensis* must have developed mechanisms that enable it to adhere, invade, and go beyond the barriers imposed by host tissues (Lenzi et al., 2000). The ability of cells to interact with each other in an orderly manner depends on multiple interactions that allow adhesion between cells and their extracellular environment that are mediated cell adhesion (Troyanovsky , 1999) adherence of the pathogen leads to the recognition of carbohydrates and protein ligands on the surface of the host cell or extracellular matrix proteins (ECM) (Patti et al. 1994). The large number of tissue types that fungi can colonize and infect suggests that they use a variety of surface adhesion molecules (Sullivan et al . , 2004) .

Proteins present in the extracellular matrix such as fibronectin and laminin , were employed in the next step to show the action of the same substance and incorporated into the nanostructured system to inhibit the adhesion, for it was constructed a curve of accession which simulate in vitro the adhesion of the fungus extracellular matrix fibronectin and laminin , we observe that the best time of accession was 3hrs (figure 10), subsequently after better standardize the time of accession if the treatment was performed with 24hr and observe that the two matrices a significant inhibition of adhesion , the dodecyl presented 64 % dodecyl and SN + with 81 %

inhibition of adhesion to fibronectin matrix , since for the laminin matrix was observed with 75 % dodecyl and SN + dodecyl with 82.4 % inhibition of adhesion , showing that effectively elected the natural product produces significantly inhibition of adhesion and it gets bigger in presence the nanocarrier .

The protocatecuics acids have the structure 3,4- dihydroxybenzoic acid , this structure define the biological effects of the compound in laboratory and animal studies have demonstrated that are effective anticarginogênicos protocatecuics acid with antioxidant properties as antifungal effects against dermatophytes , protects against oxidative stress , exerts preventive effects on cardiovascular diseases that are associated with free radicals (REIS , 2010) .

However the fraction dodecyl presented a differentiated action in its antifungal activity as was demonstrated earlier this is carbonic chain possibly the side chain that interacts more efficiently with the membrane of the fungus under study , thereby exerting a greater affinity for fungal adhesins in substance by this reason possibly the antifungal effects are larger thus inhibiting the adherence of the same host.

The nanocarrier allows the antifungal effect of the substance reaches the site of action effectively including enhancement of solubility, bioavilability, stability , as well as protection from toxicity [18], and submit reports of its action antimicrobial nanoemulsions are highly stable oil- in-water emulsions composed of nanometer - sized positively charged droplets broad- spectrum activity against enveloped viruses have fungi and bacteria [36-41].

The results show that the same dodecyl and incorporated into the nanocarrier could be antifungal excellent prototypes, they showed a potent cytotoxicity and no antifungal effect with high selectivity index (SI) making it safer for the treatment of paracoccidioidomycosis, and could still become safer and more effective than amphotericin already existing which is known for its systemic toxicity, including renal, hepatic, cardiac and cause dyscrasias blood and death [32, 33].

5 - Conclusion

Our study indicate the potential effect of protocatechuic acid derivatives for the treatment of paracoccidioidomycosis, which showed strong antifungal activity against the fungi studied without cytotoxic action that makes these substances as very promising new antifungal agents. Also, the development of nanoparticle-based delivery systems represent a promising cost-effective antimicrobial therapy against

Paracoccidioides sp. Improvement of the bioavailability of drugs and reducing the frequency of dosing, long-term stability can serve as a basis for better disease management. Our initial results are presented very promising regarding the nanocarriers. Although our results have been very promising, in vivo studies should be conducted in order to understand the mechanism of action of this substance incorporated into nanocarriers.

6 – Reference:

[1] San-Blas, G., Niño-Vega, G. & Iturriaga, T. "*Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics". *Med Mycol,* vol. 40 pp 225–242, 2002.

[2] Hernández O, Tamayo D, Torres I, McEwen JG, García AM. "Kinetic analysis of gene expression during mycelium to yeast transition and yeast to mycelium germination in Paracoccidioides brasiliensis"*Biomedica*.vol.31, no 4, pp. 570-9, 2011.

[3]Blotta MH, Mamoni RL, Oliveira SJ, et al. "Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region". *Am J Trop Med Hyg*, vol. 61, pp. 390-4, 1999.

[4] Restrepo A, Jiménez BE. "Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium*". J Clin Microbiol*. Vol. 12 no 2 pp. 279-81, 1980.

[5]Mendes-Giannini MJ, Taylor ML, Bouchara JB, Burger E, Calich VL, Escalante ED, Hanna SA, Lenzi HL, Machado MP, Miyaji M, Monteiro Da Silva JL, Mota EM, Restrepo A, Restrepo S, Tronchin G, Vincenzi LR, Xidieh CF, Zenteno E. "Pathogenesis II: fungal responses to host responses", *interaction of host cells with fungi. MedMycol,* vol. 38, no. 1, pp. 113-23, 2000.

[6]Moscardi-Bacchi M, Soares A, Mendes R, Marques S, Franco M. "In situ localization of T lymphocyte subsets in human paracoccidioidomycosis". *J Med Vet Mycol*, vol.27 no.3, pp. 149-58, 1989.

[7]Scully C, de Almeida OP. "Orofacial manifestations of the systemic mycoses". *J Oral Pathol Med*. Vol. 2, no.17, pp. 289-94, 1992.

[8]Kaminagakura E, Bonan PR, Lopes MA, Almeida OP, Scully C. "Cytokeratin expression in pseudoepitheliomatous hyperplasia of oral paracoccidioidomycosis". *Med Mycol*. Vol. 44, no. 5, pp.399-404, 2006.

[9](BISINELI; TELLES; JOSIAS et al., 2001).

[10]Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. “Paracoccidioidomycosis: an update”. *Clin Microbiol,* vol. 6, no. 2, pp. 89-117,1993.

[11]Clemons KV, Feldman D, Stevens DA. “Influence of oestradiol on protein expression and methionine utilization during morphogenesis of *Paracoccidioides brasiliensis”. J Gen Microbiol*, Vol. 135, no. 6, pp. 1607-17, 1989.

[12] Coutinho, Z. F. et al. “ Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995)”. *Cad Saude Publica*, vol. 18, no. 5, pp. 1441-54, 2002.

[13]Dietze R., Berman J “Treatment of visceral leishmaniasis with amphotericin B colloidal dispersion”. *Chemotherapy*, .Vol. 45, no. 1, PP. 54-66, 1999.

[14]Lorthlary, O.; Denning, D. W.; Dupont, B. “Endemic mycosis: a treatment update: J. Antimicrob”. *Chemother*, vol. 43, pp. 321–331, 1999.

[15] Soares, E. S. “Ácidos fenólicos como antioxidantes. Revisão”. *Rev. Nutr*, vol.1, pp. 71, 2002.

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

[17]Moraes M. C.; Luqman, S.; Kondratyuk, T. P.; Petrônio, M. S.; Regasini, L. O.; Silva, D. H.; Bolzani, V. S.; Soares, C. P.; Pezzuto, “Suppression of TNF- α induced NFκB activity by gallic acid and its semi- synthetic esters: possible role in cancer chemoprevention”. *Natural Products Research* vol. **24**, pp. 1758-1765, 2010.

[18]Ximenes V. F.; Lopes,M. G.; Petrônio, M. S.; Regasini, L. O.; Silva, D. H.; Fonseca, L. M.; J “Inhibitory effect of gallic acid and its esters on 2,2'-azobis(2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH)- induced hemolysis and depletion of intracellular glutathione in erythrocytes”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 58, pp. 5355- 5362. 2010.

[19]Faria, C. M. Q. G.; Nazaré, A. C.; Petrônio, M. S.; Paracatu, L. C.; Zeraik, M. L.; Regasini, L. O.; Silva, D. H. S.; Fonseca, L. M; Ximenes, V. F. “Protocatechuic acid alkyl esters: hydrophobicity as a determinant factor for inhibition of NADPH oxidase”. *Current Medicinal Chemistry*, vol. 19, pp. 4885-4893, 2012.

[20]Flausino-Junior, O. A.; Dufau, L.; Regasini, L. O.; Petrônio, M.S.; Silva, D. H. S.; Rose, T.; Bolzani, V. S.; Reboud-Ravaux, M. “Alkyl hydroxybenzoic acid derivatives that inhibit HIV-1 protease dimerization”. *Current Medicinal Chemistry*, vol. 19, pp. 4534-4540, 2012.

[21]Gullo FP, Sardi JC, Santos VA, Sangalli-Leite F, Pitangui NS, Rossi SA, de Paula E Silva AC, Soares LA, Silva JF, Oliveira HC, Furlan M, Silva DH, Bolzani VS,

Mendes-Giannini MJ, Fusco-Almeida AM. “Antifungal activity of maytenin and pristimerin”. *Evid Based Complement Alternat Med*. pp. 340787, 2012.

[22]Husøy T, Syversen T, Jenssen J. “Comparisons of four in vitro cytotoxicity tests: The MTT assay, NR assay, uridine incorporation and protein measurements”. *Toxicol In Vitro*. Vol. 7, no. 2, pp.149-54, 1993.

[23]Vichai V, Kirtikara K. “Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening”. *Nat Protoc*, vol. 1 no. 3, pp. 1112-6, 2006.

[24]Lacaz, C.S. Franco M, Restrepo Moreno A., Del Negro G. “*Paracoccidioides brasiliensis*: morphology, evolutionary cycle, maintenance during saprophytic life, biology, virulence, taxonomy”. *CRC Press*, pp.20-27, 1994.

[25]Benard, G.; Mendes-Giannini, M.J.S. Ralph D. Feigin; James D. Cherry; Gail J. Demmler-Harrison; Sheldon L. Kaplan “Textbook of Pediatric Infections Diseases. In:. Paracoccidioidomycosis”, *Elsevier Science*, vol. 2, pp. 2762-2776, 2009,

[26]Prado L DE G, Araújo SDE A, Veloso JM, Pedroso ER. “Case of recurrent Paracoccidioidomycosis: 25 years after initial treatment”. *Braz J Infect Dis*. 2009.

[27]Harvey, A. L. “Natural products in drug discovery. Review”. *Drug Discov. Today*, vol. 13, pp. 19, 2008

[28]Sardi JCO, Almeida AMF, Mendes Giannini MJS. “New antimicrobial therapies used against fungi present in subgingival sites—a brief review”. *Archives of Oral Biology*, vol. 56 , no 10, pp. 951–959, 2011.

[29]Carrillo-Muñoz, A. J.; Giusiano, G.; Ezkurra, P. A.; Quindós, G. “Antifungal agents: Mode of action in yeast cells”. *Rev. Esp. Quimioterap*., vol.19, pp.130, 2006.

[30](Smith, 2011).

[31]Johann S, Sá NP, Lima LA, et al. “ Antifungal activity of schinol and a new biphenyl compound isolated from Schinus terebinthifolius against the pathogenic fungus Paracoccidioides brasiliensis”. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobial*s, vol. 9, no. 30, 2010.

[32] Butler WT. “Pharmacology, toxicity, and therapeutic usefulness of amphotericin B”. *Jama*. no. 195 pp. 371–375, 1966.

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

[33] Fukui H. Comparison of LNS-AmB, a novel low-dose formulation of amphotericin B with lipid nano-sphere (LNS1), with 3020 Harmsen et al. “Clinical Orthopaedics and Related Research1commercial lipid-based formulations”. *Int J Pharm*, no. 267, pp. 101–112, 2003.

[34]Sangalli-Leite F, Scorzoni L, Mesa-Arango AC, Casas C, Herrero E, Soares Mendes Gianinni MJ, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O:

"Amphotericin B mediates killing in Cryptococcus neoformans through the induction of a strong oxidative burst". *Microbes Infect*, vol. 13, no. 5, pp. 457-67, 2011.

[35]Hahn RC, Morato Conceição YT, Santos NL, Ferreira JF, Hamdan JS. "Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and in vitro resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole". *Mycoses*, Vol. 46, no. 8 pp.342-7, 2003.

[36] Boivin, G., N. Goyette, and J. Sutcliffe. 2008. NB-001, a novel nanoemulsion active against acyclovir (ACV)- and foscarnet (FOS)-resistant herpes simplex virus (HSV) 1 and 2, abstr. V-3538. Abstr. 48th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. American Society for Microbiology, Washington, DC.

[37]Hamouda, T., and J. R. Baker, Jr. 2000. Antimicrobial mechanism of action of surfactant lipid preparations in enteric gram-negative bacilli. J. Appl. Microbiol. 89:397–403.

[38]Hamouda, T., M. M. Hayes, Z. Cao, R. Tonda, K. Johnson, D. C. Wright, J. Brisker, and J. R. Baker, Jr. 1999. A novel surfactant nanoemulsion with broad-spectrum sporicidal activity against Bacillus species. J. Infect. Dis. 180:1939–1949.

[39]Hamouda, T., A. Myc, B. Donovan, A. Y. Shih, J. D. Reuter, and J. R. Baker, Jr. 2001. A novel surfactant nanoemulsion with a unique non-irritant topical antimicrobial activity against bacteria, enveloped viruses and fungi. Microbiol. Res. 156:1–7.

[40]Pannu, J., A. McCarthy, A. Martin, T. Hamouda, and J. Sutcliffe. 2008. NB-002, a novel nanoemulsion with anti-dermatophyte activity, abstr. M-2134. Abstr. 48th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. American Society for Microbiology, Washington, DC.

[41]Sutcliffe, J., D. Biedenbach, R. Jones, and T. Fritsche. 2008. Novel nanoemulsion antimicrobials tested against nine gram-positive species, abstr. F1- 3944. Abstr. 48th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. AmericanSociety for Microbiology, Washington, DC.