



**João Gabriel Giaretta Avesani**

**Síntese e avaliação  
de dimetoxichalconas halogenadas como agentes antidermatofíticos**

São José do Rio Preto

2023

**João Gabriel Giaretta Avesani**

**Síntese e avaliação  
de dimetoxichalconas halogenadas como agentes antidermatofíticos**

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

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Luis Octavio Regasini

São José do Rio Preto

2023

A955s      Avesani, João Gabriel Giaretta  
             Síntese e avaliação de dimetoxichalconas halogenadas como  
             agentes antidermatofíticos / João Gabriel Giaretta Avesani. -- São José  
             do Rio Preto, 2023  
             75 f.

             Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),  
             Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio  
             Preto  
             Orientador: Luis Octavio Regasini

             1. Dermatofitos. 2. Chalconas. 3. Metoxichalconas. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

**JOÃO GABRIEL GIARETTA AVESANI**

**Síntese e avaliação  
de dimetoxichalconas halogenadas como agentes antidermatofíticos**

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

Financiadora: CAPES

**Comissão Examinadora**

Prof. Dr. Luis Octavio Regasini

UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Orientador

Prof.<sup>a</sup>. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida

FAMERP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Lilian Cristiane Baeza

UNIOESTE – Paraná

São José do Rio Preto

06 de março de 2023

***“You, me, or nobody is gonna hit as hard as life. But it ain’t how hard you hit; it’s about how hard you can get hit, and keep moving forward. How much you can take, and keep moving forward. That’s how winning is done.”***

Rocky Balboa

Dedico esta dissertação à minha falecida avó Olívia Alves Giaretta († 29-10-2020), que sempre me zelou. Você vive em mim.

## AGRADECIMENTOS

A elaboração e conclusão desta dissertação só foi possível graças aos esforços de várias pessoas, que juntas lutam pela pesquisa, pela ciência, pela saúde coletiva, e por um país melhor.

Agradeço ao meu orientador Luis Octavio Regasini, que mais que um excelente orientador, foi e continuará sendo um pai, um amigo, um líder, que sempre é empenhado em extrair o melhor de seus alunos e orientados. Obrigado por tudo, prometo seguir firme nesta luta, e me empenhar ao máximo para ser um excelente professor como você é.

Em especial, agradeço à minha mãe, Rita Clotilde Giaretta e ao meu pai, José Carlos Avesani, pelo apoio e torcida. Prometo dar valor a todo o apoio durante esses anos, e me tornar um profissional de excelência.

Agradeço a minha companheira Marília de Oliveira que esteve presente em todos esses momentos, me apoiando e incentivando a continuar nesta luta. Muito obrigado meu amor.

A todos os meus queridos amigos que vibraram por mim.

A toda equipe do Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos - LAQ, do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Famerp, e do Núcleo de Proteômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP - Araraquara, pelo apoio, acolhimento e ensinamentos.

Ao IBILCE e todos seus funcionários.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”

## RESUMO

As dermatofitoses são infecções causadas por fungos queratinofílicos que acometem pele, pelos e unha. São as infecções prevalentes dentre as dermatomicoses, podendo atingir 15 a 32 % da população mundial. Dentre os fatores que corroboram o surgimento e manutenção das dermatofitoses, incluem-se idade, clima, classe socioeconômica e ocupação. Possuem um tratamento medicamentoso longo e de alto custo econômico, o qual promove alto índice de abandono, provocando recidivas e cronicidade. As chalconas são substâncias de plantas e que possuem inúmeros efeitos bioativos, principalmente antifúngico. Em trabalhos anteriores realizados pela equipe do Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos – LAQ, observou atividade antifúngica de dimetoxichalconas contra *Candida* spp. No presente trabalho, buscou-se a síntese e avaliação antifúngica de 12 análogos halogenados da 2',5'-dimetoxichalcona. Em uma primeira etapa avaliou-se a atividade antifúngica por meio dos valores de concentração inibitória mínima (CIM). Os compostos **3F** e **4F** apresentaram valores de CIM de 7,8 µg/mL contra cepas de *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*. A substância **4Cl** exibiu valores de CIM de 15,6 µg/mL contra cepas de *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *Microsporum canis*. Esses três compostos foram selecionados para avaliações de bioatividade adicionais (como...). O experimento de *checkerboard* indicou uma ação aditiva dos três compostos com os fármacos terbinafina, itraconazol e fluconazol, exceto **4F** que apresentou ação indiferente com o fluconazol. Para elucidar uma possível ação contra a membrana e parede celular fúngicas, foi conduzido ensaios com ergosterol e sorbitol adicionados no meio de cultura. Observou-se uma ação em membrana citoplasmática, com um aumento de 16 vezes na CIM com o meio suplementado com ergosterol. Pelo ensaio de tempo de morte foi possível verificar que **3F** e **4F** apresentaram ação fungicida, inibindo em 100% o crescimento de *T. rubrum* em 24 e 8 horas respectivamente. O composto **4Cl** exibiu ação fungistática. O ensaio de toxicidade *in vitro* foi realizado contra queratinócitos humanos (HaCaT), onde observou uma alta toxicidade e um índice de seletividade (IS) menor que 0,5. No ensaio de toxicidade *in vivo* contra larvas de *Tenebrio molitor*, as mesmas apresentaram uma taxa de 30 a 60% de sobrevivência frente as chalconas. Os resultados obtidos demonstram uma alta probabilidade no desenvolvimento de novos agentes antidermatofíticos, auxiliando assim o tratamento dessas infecções.

**Palavras-chave:** Dermatofitos. Chalconas. Metoxichalconas

## ABSTRACT

Dermatophytoses are infections caused by keratinophilic fungi that affect the skin, hair and nails. They are the most prevalent infections among dermatomycoses, affecting 15 to 32% of the world's population. Among the factors that corroborate the emergence and maintenance of dermatophytosis, include age, climate, socioeconomic class and occupation. They have a long drug treatment and high economic cost, which promotes a high rate of abandonment, causing relapses and chronicity. Chalcones are plant substances that have numerous bioactive effects, mainly antifungal. In previous works carried out by the team of the Laboratory of Antibiotics and Chemotherapeutics - LAQ, observed antifungal activity of dimethoxychalcones against *Candida* spp. In the present work, we sought the synthesis and antifungal evaluation of 12 halogenated analogues of 2',5'-dimethoxychalcone. In a first step, the antifungal activity was evaluated using the minimum inhibitory concentration (MIC) values. Compounds **3F** and **4F** showed MIC values of 7.8 µg/mL against strains of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. The **4Cl** substance exhibited MIC values of 15.6 µg/mL against strains of *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* and *Microsporum canis*. These three compounds were selected for further bioactivity evaluations (how...). The checkerboard experiment indicated an additive action of the three compounds with the drugs terbinafine, itraconazole and fluconazole, except **4F** which showed indifferent action with fluconazole. To elucidate a possible action against the fungal membrane and cell wall, tests were conducted with ergosterol and sorbitol added to the culture medium. An action on the cytoplasmic membrane was observed, with a 16-fold increase in MIC with the medium supplemented with ergosterol. By the time of death assay, it was possible to verify that **3F** and **4F** had a fungicidal action, inhibiting the growth of *T. rubrum* by 100% in 24 and 8 hours, respectively. Compound **4Cl** exhibited fungistatic action. The *in vitro* toxicity assay was carried out against human keratinocytes (HaCaT), where a high toxicity and a selectivity index (IS) lower than 0.5 were observed. In the *in vivo* toxicity test against *Tenebrio molitor* larvae, they showed a 30 to 60% survival rate against chalcones. The results obtained demonstrate a high probability in the development of new antidermatophytic agents, thus helping the treatment of these infections.

**Keywords:** Dermatophytes. Chalcone. Methoxychalcone

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	Fórmula para o cálculo do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF)	38
-----------	-------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	<i>Tinea capitis</i>	16
<b>Figura 2</b>	<i>Tinea corporis</i>	17
<b>Figura 3</b>	Características macromorfológicas do <i>Trichophyton rubrum</i>	19
<b>Figura 4</b>	Características micromorfológicas do <i>Trichophyton rubrum</i>	19
<b>Figura 5</b>	Características macromorfológicas do <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	20
<b>Figura 6</b>	Características micromorfológicas do <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	20
<b>Figura 7</b>	Características macromorfológicas do <i>Microsporum canis</i>	21
<b>Figura 8</b>	Características micromorfológicas do <i>Microsporum canis</i>	21
<b>Figura 9</b>	Características macro do <i>Epidermophyton floccosum</i>	22
<b>Figura 10</b>	Características micromorfológicas do <i>Epidermophyton floccosum</i>	22
<b>Figura 11</b>	Modelo proposto da degradação da queratina por dermatófitos	23
<b>Figura 12</b>	Compostos com atividade antifúngica do trabalho de Mirzaei et al., 2020	29
<b>Figura 13</b>	Estrutura da 2'-hidroxichalcona do trabalho de Bila et al., 2021	30
<b>Figura 14</b>	Estrutura da <i>trans</i> -chalcona estudada nos trabalhos de Bitencourt et al., (2013, 2019)	30
<b>Figura 15</b>	Composto <b>4a</b> do trabalho de Illicachi et al., 2017	31
<b>Figura 16</b>	Compostos com atividade antifúngica do trabalho de López et al., 2008	31
<b>Figura 17</b>	Estrutura da 2',4'-dimetoxichalcona e 2',5'-dimetoxichalcona	32
<b>Figura 18</b>	Valores de CIM e CFM do trabalho de Marques et al., 2020	33
<b>Figura 19</b>	Fluxograma para avaliação de efeito sinérgico dos compostos e diferentes fármacos antifúngicos	38
<b>Figura 20</b>	Estrutura dos 12 análogos derivados da 2',5'-dimetoxichalcona da quimioteca do Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos (LAQ)	42
<b>Figura 21</b>	Tempo de morte de <i>Trichophyton rubrum</i> CBS118892 na presença de <b>3F</b> , <b>4F</b> e <b>4Cl</b>	48
<b>Figura 22</b>	Viabilidade das células HaCaT frente aos compostos <b>3F</b> , <b>4F</b> e <b>4Cl</b>	49
<b>Figura 23</b>	Toxicidade da chalcona <b>3F</b> contra larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	50
<b>Figura 24</b>	Toxicidade da chalcona <b>4F</b> contra larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	51
<b>Figura 25</b>	Toxicidade da chalcona <b>4Cl</b> contra larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	51
<b>Figura 26</b>	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da chalcona <b>2Cl</b> (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	69
<b>Figura 27</b>	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da chalcona <b>3Cl</b> (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	69
<b>Figura 28</b>	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da chalcona <b>4Cl</b> (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	70
<b>Figura 29</b>	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da chalcona <b>3F</b> (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	70

<b>Figura 30</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da chalcona <b>4F</b> (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	71
<b>Figura 31</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da chalcona <b>2Br</b> (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	71
<b>Figura 32</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da chalcona <b>3Br</b> (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	72
<b>Figura 33</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da chalcona <b>4Br</b> (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	72
<b>Figura 34</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da chalcona <b>3CF3</b> (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	73
<b>Figura 35</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da chalcona <b>4CF4</b> (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	73
<b>Figura 36</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da chalcona <b>4OCF3</b> (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	74

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Origem dos isolados clínicos utilizados neste estudo	36
<b>Tabela 2</b>	Atividade antifúngica de metoxichalconas expressa em valores de CIM e CFM ( $\mu\text{g/mL}$ ) contra cepas de <i>Trichophyton sp</i> , <i>Microsporum sp</i> , e <i>Epidermophyton sp</i>	44
<b>Tabela 3</b>	Efeito sinérgico entre <b>3F</b> e diferentes fármacos contra <i>Trichophyton rubrum</i> (TRCBS 118892)	45
<b>Tabela 4</b>	Efeito sinérgico entre <b>4F</b> e diferentes fármacos contra <i>Trichophyton rubrum</i> (TRCBS 118892)	45
<b>Tabela 5</b>	Efeito sinérgico entre <b>4Cl</b> e diferentes fármacos contra <i>Trichophyton rubrum</i> (TRCBS 118892)	46
<b>Tabela 6</b>	Valores de CIM expressos em ( $\mu\text{g/mL}$ ) das metoxichalconas na presença e ausência de ergosterol	47
<b>Tabela 7</b>	Valores de CIM expressos em ( $\mu\text{g/mL}$ ) das metoxichalconas na presença e ausência de sorbitol	48
<b>Tabela 8</b>	Toxicidade contra queratinócitos (HaCaT) e índice de seletividade (IS)	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>ABD</b>	Agar Batata Dextrose
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>Br</b>	Bromo
<b>CBS</b>	Fungal Biodiversity Center
<b>CCD</b>	Cromatografia em Camada Delgada
<b>CFM</b>	Concentração Fungicida Mínima
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>Cl</b>	Cloro
<b>CSD</b>	Caldo Sabouraud Dextrose
<b>d</b>	duplete
<b>dd</b>	Duplo duplete
<b>ddd</b>	Duplo duplo duplete
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EF</b>	<i>Epidermophyton floccosum</i>
<b>F</b>	Flúor
<b>Hz</b>	Hertz
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração
<b>ICIF</b>	Índice de Concentração Inibitória Fracionária
<b>IS</b>	Índice de seletividade
<b>J</b>	Constante de acoplamento
<b>KOH</b>	Hidróxido de potássio
<b>MC</b>	<i>Microsporium canis</i>
<b>mg</b>	Miligrama
<b>mL</b>	mililitro
<b>mmol</b>	milimol
<b>nm</b>	nanômetro
<b>O</b>	Oxigênio
<b>OCH<sub>3</sub>(OMe)</b>	metoxila
<b>PDA</b>	Potato dextrose agar
<b>ppm</b>	parte por milhão
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>s</b>	simpleto
<b>S</b>	enxofre
<b>t</b>	tripleto
<b>TM</b>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
<b>TMS</b>	Tetrametilsilano
<b>TR</b>	<i>Trichophyton rubrum</i>
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colônia
<b>µg/mL</b>	microgramas por mililitro
<b>δ<sub>H</sub></b>	deslocamento químico de hidrogênio
<b>°C</b>	graus Celsius

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	15
1.1.	Dermatofitoses	15
1.2.	Aspectos Biológicos dos Dermatófitos	18
1.3.	Importância clínica das micoses superficiais e dados epidemiológicos	24
1.4.	Fármacos Antifúngicos e Tratamento de Dermatofitoses	26
1.5.	Mecanismos de resistência	28
1.6.	Chalconas e seus análogos	29
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	32
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	34
3.1.	Objetivo geral	34
3.2.	Objetivos específicos	34
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	35
4.1.	Procedimentos químicos gerais	35
4.2.	Síntese	35
4.3.	Microrganismos	36
4.4.	Preparo dos inóculos e diluição dos compostos	36
4.5.	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)	37
4.6.	Análise de efeito da combinação das dimetoxichalconas com fármacos antifúngicos pela metodologia de <i>checkerboard</i>	37
4.7.	Análise do modo de ação contra membrana e parede celular fúngica	38
4.8.	Tempo de morte	39
4.9.	Ensaio de toxicidade contra queratinócitos	39
4.10.	Toxicidade contra larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	40
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	41
5.1.	Metoxichalconas	41
5.2.	Atividade antifúngica das metoxichalconas contra dermatófitos	42
5.3.	Atividade antifúngica da combinação de metoxichalconas com fármacos antifúngicos	45
5.4.	Ação das metoxichalconas em membrana citoplasmática e parede celular fúngica	46
5.5.	Tempo de morte de <i>Trichophyton rubrum</i> (CBS)	48

5.6.	Ensaio de toxicidade contra queratinócitos humanos (HaCaT) .....	49
5.7.	Toxicidade contra larvas de <i>Tenebrio molitor</i> .....	50
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	53
	REFERÊNCIAS .....	54
	APÊNDICE A: ANÁLISES DE RESSÔNANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR .....	65

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Dermatofitoses

As infecções por fungos são classificadas quanto ao envolvimento tecidual e ao modo de entrada do parasito no hospedeiro. Podem ser categorizadas como superficiais, cutâneas e subcutâneas, ou ainda sistêmicas, podendo adentrar ao hospedeiro por traumas ou inalação. Segundo Zaitz, as micoses superficiais, ou dermatomicoses, podem ser classificadas em: superficiais propriamente ditas e superficiais cutâneas. As superficiais propriamente ditas são aquelas que acometem a camada córnea da pele e a cutícula do pelo, sem provocar nenhuma, ou resposta imunológica baixíssima. Este fato auxilia na promoção de uma infecção crônica e assintomática. Incluem nesta classificação a pitiríase versicolor, piedra branca, piedra preta e tinha negra. As micoses superficiais cutâneas acometem os pelos, a pele e as unhas, e seus agentes etiológicos são os dermatófitos, leveduras do gênero *Candida* e fungos filamentosos não dermatófitos hialinos ou demáceos (MARKANTONATOU et al., 2023; WEITZMAN et al., 1995; ZAITZ et al., 2010).

Os dermatófitos constituem um grupo de fungos queratinofílicos que utilizam a queratina presente na pele, pelos e unha, como fonte de aminoácidos. Esses fungos pertencem ao filo Ascomycota, a classe Eurotiomycetes, a ordem Onygenales e a família Arthrodermataceae. Atualmente existem sete gêneros de dermatófitos: *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Nannizzia*, *Paraphyton*, *Lophophyton*, *Microsporum*, e *Arthroderma*. Os três principais gêneros de fungos dermatófitos de interesse clínico são: *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton* (ARAYA et al., 2020; HOOG et al., 2017; WEITZMAN et al., 1995).

Algumas espécies de dermatófitos vivem no solo e são denominadas geofílicas (Exemplo: *Microsporum gypseum*), outras vindas de animais são chamadas zoofílicas (Exemplo: *Microsporum canis*) e aquelas que acometem preferencialmente o homem, antropofílicas (Exemplo: *Trichophyton rubrum*). Os dermatófitos antropofílicos são os mais bem adaptados ao homem, e são facilmente transmitidos entre os mesmos. Isso se dá pelo longo tempo de interações e adaptações entre os dermatófitos e o homem que ocorrem desde sua origem. Algumas adaptações que ocorreram e foram de suma importância foram: crescimento à temperatura corporal, penetração das barreiras, lise e absorção dos tecidos e nutrientes, respectivamente, por meio de enzimas e resistência ao sistema imunológico (GNAT et al., 2019; KÖHLER et al., 2017).

As espécies zoofílicas também tem uma relativa facilidade de acometerem os humanos, por infectarem mamíferos, e pela relação cotidiana com os mesmos. Alguns relatos na literatura demonstram que animais domésticos como cães, gatos, porquinho-da-india, etc, são reservatórios de dermatófitos e promovem micoses crônicas aos humanos e vice-versa. Isto se dá pelo contato contínuo entre animal e homem, e pelo difícil tratamento das micoses nos animais (falta de controle sob os animais de estimação, pelos, dificuldade em administrar os fármacos). Geralmente causam infecções mais agudas e com sintomas inflamatórios mais expressivos do que os agentes antropofílicos (BAUMGARDNER et al., 2017; NEVES et al., 2018).

Os dermatófitos classificados como geofílicos são adaptados ao solo, e um fato que explica fungos queratinofílicos vivendo nos solos é a presença de massas de origem animal, e solos fertilizados, como em fazendas e jardins. Essas espécies, convivendo e competindo com outros microrganismos, apresentam características adaptativas que provocam infecções mais agressivas e agudas, assim como as zoofílicas (SHAMSIZADEH et al., 2022).

Dentre os dermatófitos, os do gênero *Microsporum* têm predileção por pele e pelos, já os do gênero *Epidermophyton*, por pele e unha, os dermatófitos pertencentes ao gênero *Trichophyton* infectam tanto pele e pelos, quanto as unhas (GRÄSER et al., 2018; ZAITZ et al., 2010).

As manifestações clínicas causada pelos dermatófitos variam conforme o local de infecção, por exemplo, a *Tinea capitis* ou Tinha do couro cabeludo provoca a queda dos cabelos e inflamação pontual ou múltipla (**Figura 1**), a *Tinea corporis* ou Tinha do corpo (**Figura 2**) gera lesões anulares, de crescimento centrífugo e cura central (LIN et al., 2021; ZAITZ et al., 2010).

**Figura 1.** *Tinea capitis*



**Fonte:** CDC-PHIL, ID: 17577.

**Figura 2.** *Tinea corporis*



**Fonte:** Fiocco et al., 2022.

As micoses superficiais são uma das formas de infecção mais comuns prevalentes no globo, podendo atingir de 15 a 32 % da população mundial. (ALEMAYEHU et al., 2016; ALMEIDA et al., 2009; HAVLICKOVA et al., 2008).

A maioria dos estudos focados na epidemiologia das micoses cutâneas, tem por agente etiológico, os dermatófitos (60–90 %), seguido pelas leveduras (5–30 %) e os fungos filamentosos não-dermatófitos (FFND) (3–12 %) (ALMEIDA et al., 2009; NASR et al., 2015).

As micoses em geral, são de difícil tratamento, pois os fungos apresentam muitas semelhanças bioquímicas com os animais, este fato se dá pela relação filogenética, que mostra uma ancestralidade em comum entre os reinos Fungi e Animalia. Assim os fungos apresentam poucos sítios de ação seletiva para os fármacos antifúngicos, e estes causam inúmeros efeitos adversos para os humanos. No caso dos dermatófitos, além de terem um crescimento lento, suas hifas se propagam pelos tecidos, tornando o tratamento longo, e promovendo um alto índice de abandono pelos pacientes (RAJAGOPALAN et al., 2018).

Tratamentos auxiliares para as dermatofitoses são de interesse clínico, pois os fármacos antifúngicos têm mecanismos de ação similares, e qualquer substância que acelere o tratamento, e o torne mais eficiente, tem grande importância clínica e impacto na qualidade de vida do paciente (GUPTA et al., 2019a).

## 1.2. Aspectos biológicos dos dermatófitos

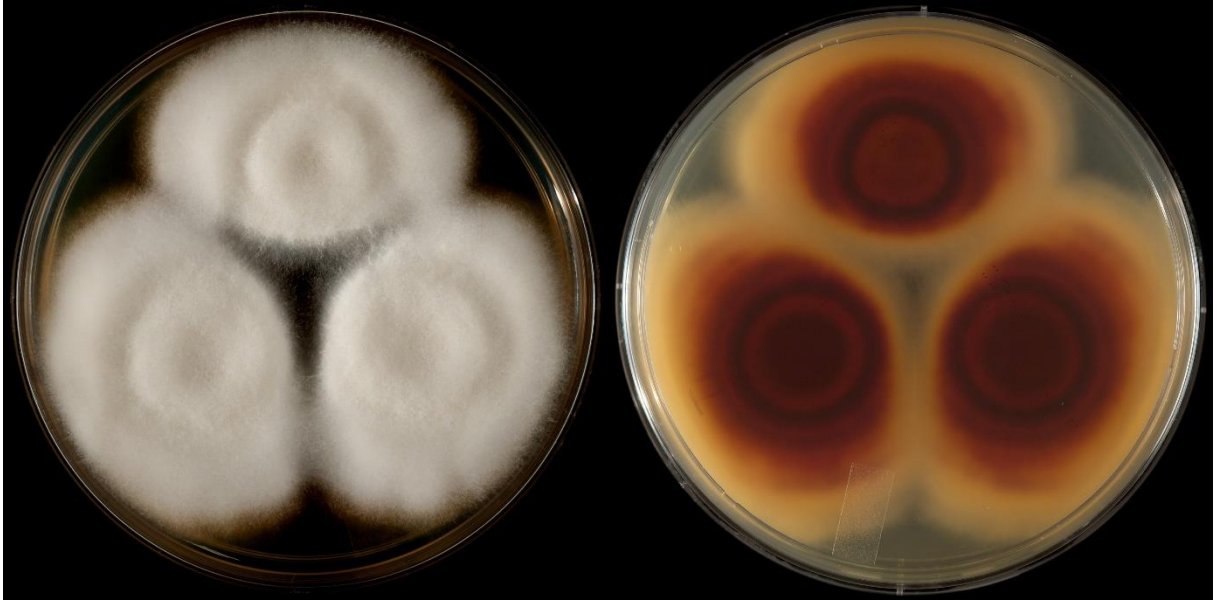
Os fungos dermatófitos formam hifas septadas hialinas e conídios que diferenciam uma espécie da outra. Para um diagnóstico micológico correto, sempre é necessário observar os aspectos macromorfológicos e micromorfológicos, o primeiro diz respeito a morfologia da colônia, verso e reverso, e o segundo, a morfologia microscópica. Os fungos dermatófitos se reproduzem assexuadamente pela produção de esporos, que podem ser macroconídios ou microconídios, ou ambos. (WHITE et al., 2014).

No gênero *Trichophyton* ocorre uma predominância dos microconídios e uma escassez de macroconídios, tornando sua identificação pelas características micromorfológicas mais delicada comparada aos demais dermatófitos. Os principais representantes deste gênero são (Figura 1): *Trichophyton mentagrophytes*, possui colônia pulverulenta branca ou creme, de reverso marrom claro ou amarelado, expressando microconídios redondos e abundantes e hifas em espiral; *Trichophyton rubrum*, apresenta colônia branca filamentosa com reverso vermelho-sangue, e possui microconídios piriformes abundantes; *Trichophyton tonsurans*, expressa colônia cerebriforme bege e reverso acastanhado, possui microconídios abundantes e clavados (ZAITZ et al., 2010).

No gênero *Microsporum*, os macroconídios são abundantes e de fácil diferenciação, sendo os dois principais representantes (Figura 2): *Microsporum canis* apresenta colônia filamentosa branca com reverso amarelo, e macroconídios fusiformes, com mais de seis septos, com pontas afiladas e parede espessa rugosa; *Microsporum gypseum* expressa colônia pulverulenta cor bege com reverso acastanhado, e macroconídios com até seis septos, pontas arredondadas e parede fina e lisa (ZAITZ et al., 2010).

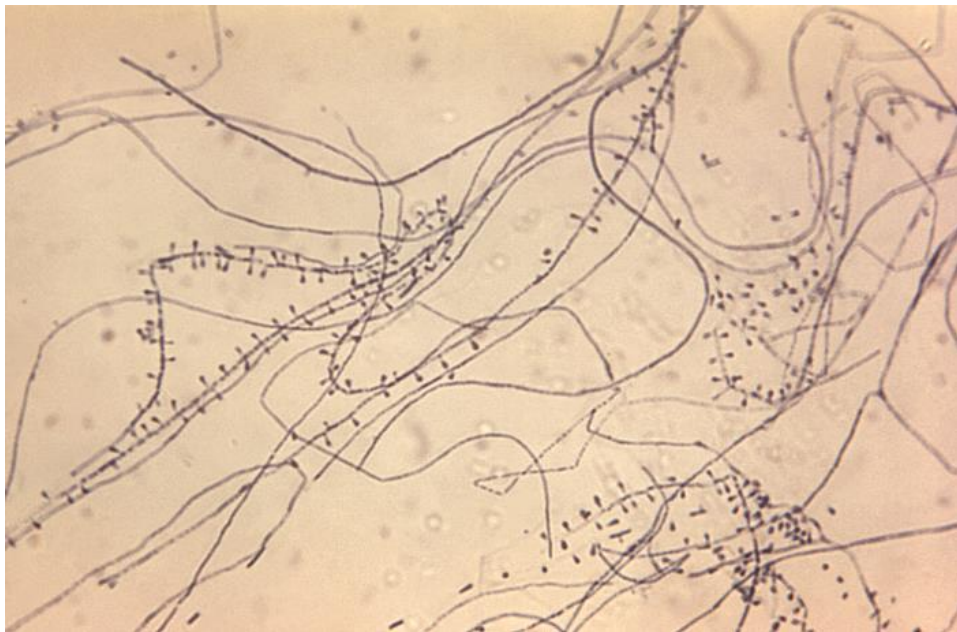
O gênero *Epidermophyton* tem como seu principal representante o *Epidermophyton floccosum* (Figura 3), expressa colônia filamentosa branca e abundantes macroconídios de parede lisa, com até quatro septos e em forma de clava, os microconídios são ausentes (ZAITZ et al., 2010).

**Figura 3.** Características macromorfológicas do *Trichophyton rubrum*



**Fonte:** <https://www.microbiologybook.org/mycology/2018mycology-4.htm>.

**Figura 4.** Características micromorfológicas do *Trichophyton rubrum*



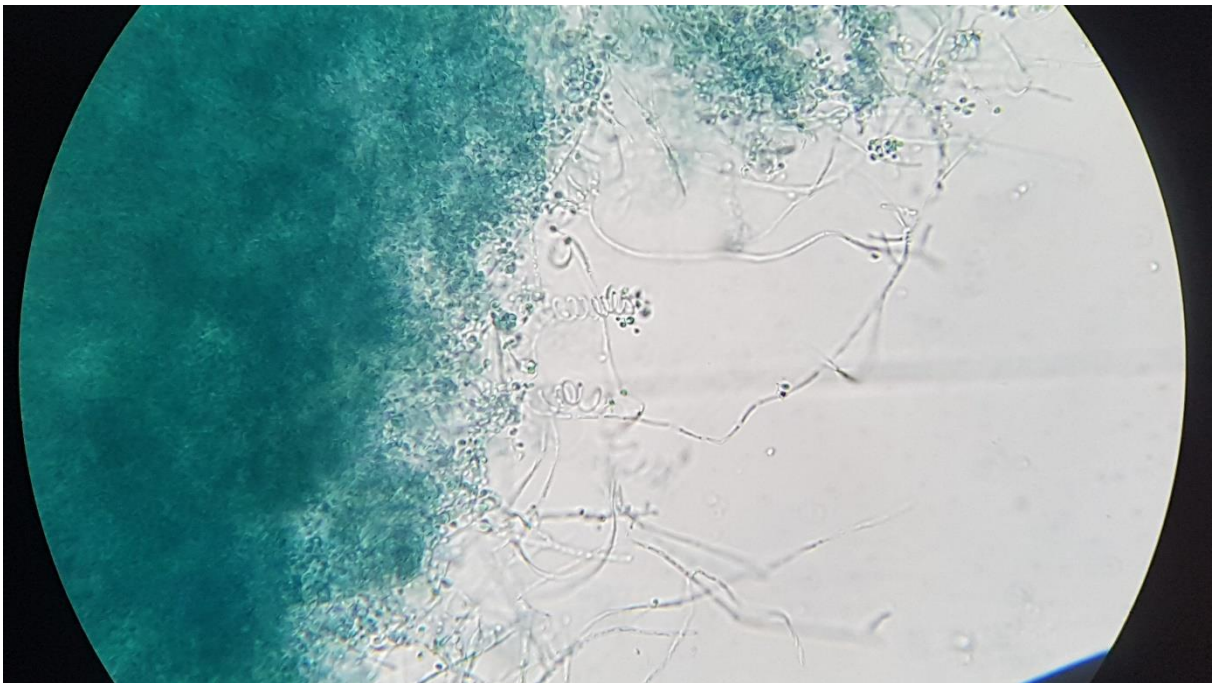
**Fonte:** CDC-PHIL, ID: 16123.

**Figura 5.** Características macromorfológicas do *Trichophyton mentagrophytes*



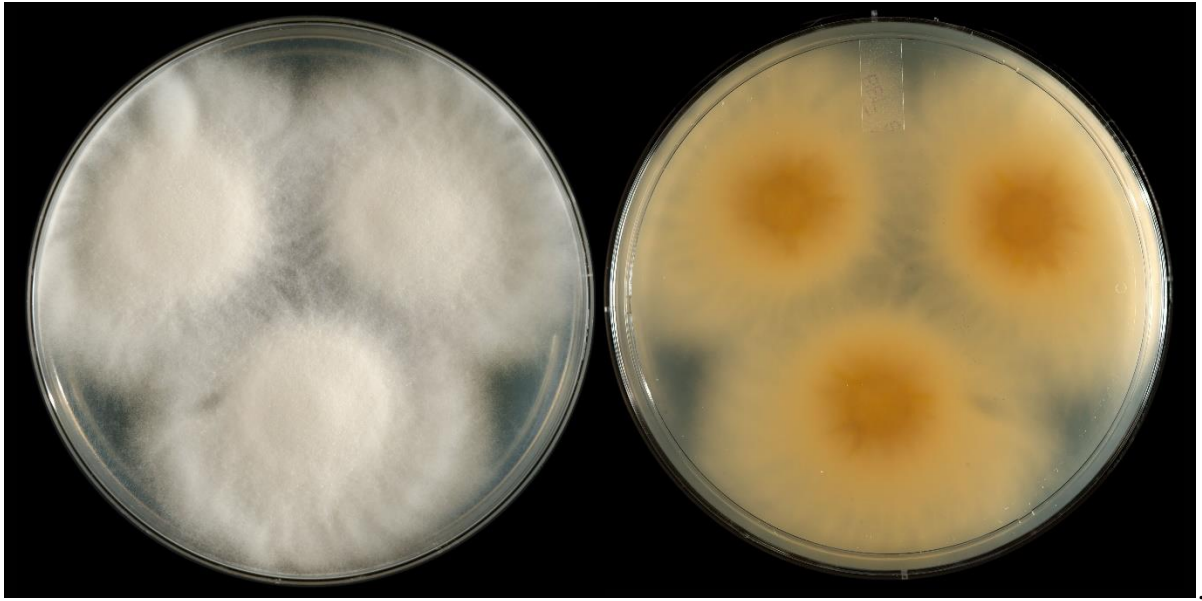
**Fonte:** CDC-PHIL, ID: 22116.

**Figura 6.** Características micromorfológicas do *Trichophyton mentagrophytes*



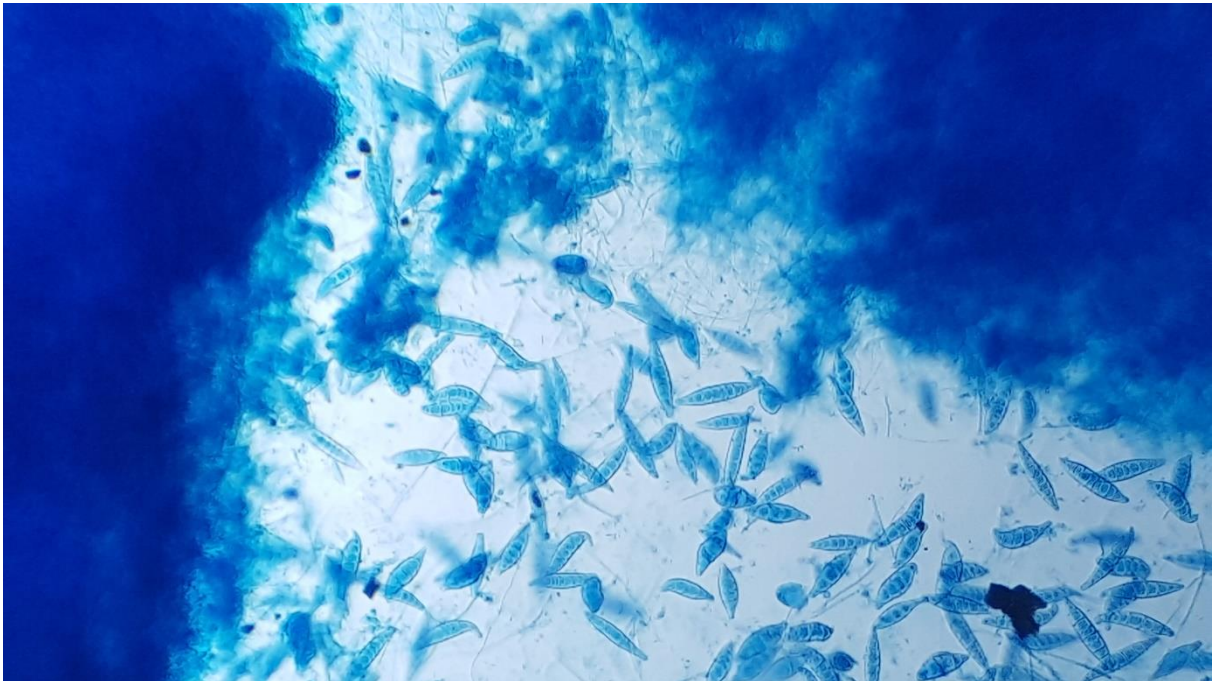
**Fonte:** Aatoria própria.

**Figura 7.** Características macromorfológicas do *Microsporium canis*



**Fonte:** <https://www.microbiologybook.org/mycology/2018mycology-4.htm>.

**Figura 8.** Características micromorfológicas do *Microsporium canis*



**Fonte:** Autoria própria.

**Figura 9.** Características macro do *Epidermophyton floccosum*



**Fonte:** <https://www.adelaide.edu.au/mycology/fungal-descriptions-and-antifungal-susceptibility/dermatophytes/epidermophyton>.

**Figura 10.** Características micromorfológicas do *Epidermophyton floccosum*

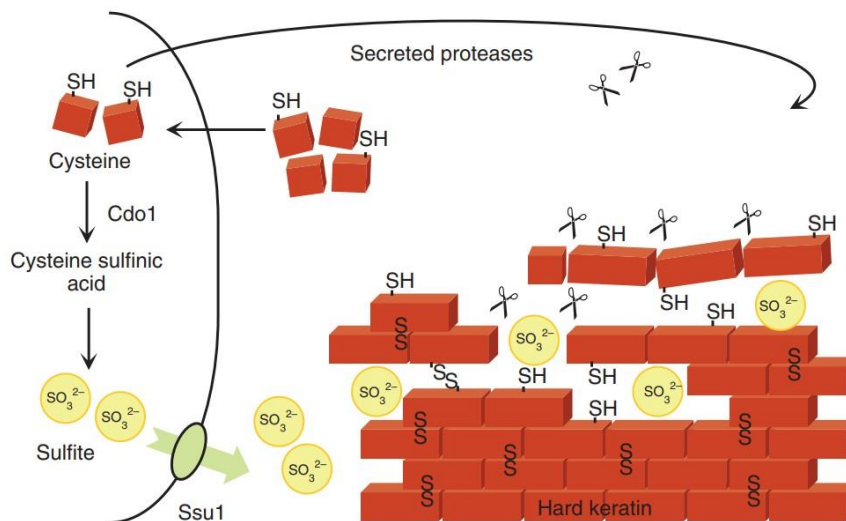


**Fonte:** Autorialia própria.

A proteína alvo para a nutrição e proliferação dos dermatófitos é a queratina presente na pele, cabelo e unhas. As enzimas que quebram a queratina são chamadas de queratinases, ou proteases queratinolíticas. Essas enzimas auxiliam na invasão dos tecidos e provêm aminoácidos para a nutrição fúngica. Os dermatófitos hidrolisam essas proteínas complexas por meio da produção de endo e exoproteases. As endoproteases clivam ligações internas dos polipeptídeos, já as exoproteases quebram as ligações *N*- ou *C*- terminal. Alguns exemplos de endoproteases são fungisinas (Mep3, Mep4) e subtilisinas (Sub3, Sub4). Um exemplo de exoprotease é a dipeptidil-peptidase IV (Dpp IV) secretada pelo *Trichophyton equinum* (BALDO et al., 2011; SARDANA et al., 2021)

A queratina presente na pele, pelos e unhas, é uma proteína complexa formada por cerca de 20 aminoácidos, dentre eles, a cisteína. A cisteína é um dos aminoácidos mais abundantes na composição da queratina. O enxofre presente na composição da cisteína, forma ligações dissulfeto, conferindo maior resistência e rigidez à queratina. A bomba de efluxo de sulfito (SSU1) presente nos dermatófitos, secreta sulfito no meio extracelular que cliva a ligação dissulfeto da queratina em cisteína e *S*-sulfocisteína. A queratina enfraquecida, e os aminoácidos mais expostos facilitam a ação das endo e exoproteases. Níveis intracelulares elevados de cisteína são tóxicos para os dermatófitos, e são metabolizados em sulfito via cisteína ácido sulfínico pela ação da cisteína dioxigenase (Cdo1). Este mecanismo facilita a degradação da queratina quanto a desintoxicação da cisteína (Figura 11) (GRUMBT et al., 2013; MOSKALUK et al., 2022).

**Figura 11.** Modelo proposto da degradação da queratina por dermatófitos



**Fonte:** GRUMBT et al., 2013.

Os dermatófitos ainda produzem outras enzimas incluindo lipases, elastases, colagenases, fosfatases e esterases, que promovem a invasão ao hospedeiro e assimilação de outros nutrientes. Durante a invasão dos tecidos pelos dermatófitos, várias proteínas de choque térmico (Hsp) são superexpressas (Hsp60, Hsp70, Hsp78, Hsp90). Estas proteínas são chaperonas que se acumulam no citoplasma em resposta ao aquecimento e alterações do ambiente como estresse oxidativo e fármacos antifúngicos. A virulência fúngica diminui drasticamente quando 17-alilamino-17-desmetoxigeldanamicina (17-AAG), um inibidor de Hsp90) é utilizada (MARTINEZ-ROSSI et al., 2017; JACOB et al., 2015).

### 1.3. Importância clínica das micoses superficiais e dados epidemiológicos

Devido a globalização e o alto fluxo de pessoas por várias regiões do mundo, os dados epidemiológicos das dermatofitoses variaram ao longo do tempo, mas de maneira geral, cada região possui agentes etiológicos predominantes. Cada região possui espécies de dermatófitos mais prevalentes do que em outras. As regiões de clima tropical e subtropical tendem a apresentar mais casos de dermatofitoses do que regiões de clima mais frio. E até mesmo uma espécie prevalente, em determinada região, pode perder seu posto para outra vinda de outra região. Um exemplo é a disseminação de *T. tonsurans*, dermatófito causador de infecções do couro cabeludo (tinea capitis) nos Estados Unidos da América, Europa e América do Sul nas últimas décadas (ELEWSKI et al., 2000; SIDRIM et al., 2013; VERMA et al., 2021).

Muitos fatores estão estritamente relacionados com o surgimento e manutenção das dermatofitoses, como por exemplo a idade, tinea capitis tende a ser mais prevalente em crianças, enquanto tinea pedis mais em idosos. A questão das classes sociais, onde muitos não tem acesso a qualidade de vida (saúde, saneamento básico, educação) também é um fator, não só para o surgimento das dermatofitoses, como de muitas outras doenças. Relacionado a este fator, uma má alimentação provoca um sistema imune deficitário, e aumenta as chances de infecções no geral. Outro fator é em relação a ocupação de cada indivíduo, onde soldados, atletas e trabalhadores rurais tem maiores chances de se contaminarem com fungos dermatófitos (BAVEJA et al., 2021; NENOFF et al., 2014a; WEITZMAN et al., 1995).

Outro fator importante nas dermatofitoses é a resposta do sistema imunológico frente a determinado patógeno. Deng e colaboradores (2019) estudaram a expressão genética em queratinócitos humanos (em cultura de células HaCaT) frente a infecção por dermatófitos antropofílicos (*T. rubrum*) e geofílicos (*M. gypseum*). Neste trabalho, observou-se a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CXCL8 e IL-6), as quais foram reguladas

positivamente depois que as células HaCaT foram infectadas por *M. gypseum*, enquanto genes da via metabólica (ACLY, SQLE, MSMO1 e FDPS) foram regulados em células HaCaT expostas a *T. rubrum*. Deng e colaboradores evidenciaram que os dermatófitos antropofílicos causam infecções mais brandas e crônicas, já os geofílicos, infecções mais agressivas e agudas (DENG et al., 2019).

Pessoas com outras comorbidades como alterações do sistema imune, disfunções do sistema circulatório, e diabetes tendem a ser mais suscetíveis as dermatofitoses e outras dermatomicoses. Debilidades do sistema imune, como a infecção pelo HIV, facilitam a as infecções fúngicas, assim como distúrbios da circulação comprometem principalmente as extremidades, facilitando assim afecções e infecções, como as onicomicoses. A diabetes é uma das doenças crônicas não transmissíveis mais frequentes no mundo, e se caracteriza por hiperglicemia. Além de alterar o sistema circulatório e o imune, a hiperglicemia proporciona condições favoráveis a instalação de infecções (DALLA LANA et al., 2016; GUPTA et al., 2000; MALTA et al., 2019).

Em 2017, Barroso investigou por meio de exames micológicos 202 pacientes com lesões sugestivas de dermatofitoses. Desses, 142 (70%) deram negativo para fungos, 32 (16%) positivo para dermatófitos e 28 (14%) positivo para outras espécies de fungos. Das 32 amostras positivas para dermatófitos, 15 (47%) foram de *T. rubrum*, já *T. tonsurans* e *M. canis* foram encontrados na mesma proporção de 5 isolados clínicos (16%), 4 isolados (12%) foram de *T. mentagrophytes*, 2 (6%) de *M. gypseum* e 1 isolado (3%) de *T. verrucosum* (BARROSO et al., 2017).

Em um estudo conduzido por Bontems e colaboradores no período de 2001 até 2018 na Suíça, foram coletadas 77.716 amostras dermatológicas, onde 10.958 deram positivo para dermatófitos. Destas amostras, os organismos isolados mais prevalentes foram: *T. rubrum* (6.707), *T. interdigitale* (2.207), *T. mentagrophytes* (590) e *M. canis* (369). A presença de espécies africanas de dermatófitos (*T. violaceum* (244) e *T. soudanense* (197)) demonstra e regionalidade dos dermatófitos, pois a população de origem africana é expressiva no país. Quanto a localidade de acometimento, 5.803 casos são de tinea unguium, 2.439 de tinea pedis, 1.006 de tinea corporis, e 830 casos de tinea capitis (BONTEMS et al., 2020).

Em um trabalho realizado em Odisha na Índia entre 2018 e 2020, foram analisadas 1.200 amostras de casos suspeitos de dermatofitoses. Dessas amostras, 720 (60%) deram positivo para presença de dermatófitos. O gênero *Trichophyton* foi o mais isolado, presente em 699 amostras (97%), *T. mentagrophytes* e *T. rubrum* juntos contabilizam 654 isolados (91%) (JAIN et al., 2020).

Um artigo de revisão elaborado por Wang e colaboradores, reuniu 123 artigos descrevendo 160 casos de dermatofitose sistêmica (ou invasiva) entre 2000 e 2020. Entre os isolados, os dermatófitos mais frequentes foram: *T. rubrum*, com uma prevalência de 53,1%, seguido pelo *T. mentagrophytes* (7,5%), *M. canis* (6,9%), *T. tonsurans* (5,6%), *T. interdigitale* (5,0%) e *T. violaceum* (3,8%). Os fatores predisponentes mais comuns foram: dermatofitose superficial (56,9%), transplante de órgãos (26,9%), uso de imunossupressores (15,6%), diabetes (14,4%) e traumas físicos (6,9%). Este estudo corrobora o fato de micoses sistêmicas serem prevalentes em indivíduos com comorbidades, e imunocomprometidos. (WANG et al., 2021).

Uma revisão realizada em 2021, agrupou 24 artigos tratando sobre a prevalência das dermatofitoses no Brasil no período de 2011 até 2020. A amostragem de cada artigo variou de 45 à 36.446 indivíduos, e uma média de prevalência de 25% foi encontrada (4 –88,5%). Tinea unguium (48%) e tinea pedis (30%) foram as dermatofitoses mais comuns. Quanto ao agente etiológico, *T. rubrum* foi o mais isolado com 66% dos casos, seguido por *T. interdigitale* com 22% e *T. mentagrophytes* com 4% (de OLIVEIRA PEREIRA et al., 2021).

Outro estudo feito na cidade de Belém (Pará, Brasil), entre os anos de 2010 e 2012, analisou 145 paciente positivos para dermatofitose. Quanto a localidade, onicomicose foi a mais prevalente com 38,6%, seguido de tinea corporis com 24,1%, tinea capitis com 22,1% e tinea pedis com 15,2%. Uma outra informação interessante é de que 31% dos pacientes não compareceram as visitas de acompanhamento. Este dado corrobora com o fato da alta porcentagem de abandono, das consultas e/ou do tratamento. Com melhoras visíveis, o paciente se sente seguro em não ir mais ao médico, e dependendo do grau da melhora, pode até interromper o tratamento por conta própria (PIRES et al., 2014).

#### **1.4. Fármacos antifúngicos e tratamento de dermatofitoses**

O tratamento para infecções fúngicas é determinado: pelo agente etiológico, o local acometido e extensão das lesões, e pode ser de uso tópico ou sistêmico. As preparações de uso tópico mais comumente usadas, nas mais diversas micoses possuem cetoconazol, miconazol, terbinafina, isoconazol, butenafina e clotrimazol como fármacos. Já para o tratamento sistêmico são utilizados os fármacos griseofulvina, anfotericina B, terbinafina e azólicos, como cetoconazol e fluconazol (ALI MALAYERI et al., 2018; DALLA LANA et al., 2016).

Os principais mecanismos de ação dos fármacos antifúngicos são: complexação com esteróis de membrana, formando poros e desestabilizando a mesma, como os polienos

anfifílicos (Ex. nistatina e anfotericina B); inibição de enzimas da biossíntese de ergosterol, como os azóis (Ex. fluconazol e itraconazol) e as alilaminas (Ex. butenafina e terbinafina); inibição de enzimas da biossíntese de glucanas de parede celular fúngica como as equinocandinas (Ex. caspofungina). Ainda se tem os fármacos que inibem a biossíntese proteica e os ácidos nucleicos como a sordarina, e a 5-flucitosina respectivamente. Os fármacos antifúngicos possuem ação em alvos celulares similares, comumente presentes em outras células eucarióticas (como as células humanas), isso se dá pela proximidade evolutiva molecular entre os fungos e os animais (ABASTABAR et al., 2019; KHURANA et al., 2019; POOJARY et al., 2017 SAHNI et al., 2018).

Para o tratamento das dermatofitoses, os fármacos azólicos e a alilaminas são os mais utilizados, principalmente a terbinafina (tópico e oral), o itraconazol e a griseofulvina (oral) (MINISTÉRIO DA SAUDE, 2002; GUPTA et al., 2019b).

Para o tratamento de *tinea corporis*, fármacos de uso tópico são bem eficientes. Em casos crônicos, com lesões extensas, ou mais de um local acometido, o tratamento via oral é utilizado. O Ministério da Saúde do Brasil, preconiza griseofulvina na dose de 10 a 20 mg/kg de peso durante 30 dias, ou terbinafina na dose de 250 mg/dia, se acima de 40 kg (BRASIL, 2002; SAHOO et al., 2017).

No caso de *tinea pedis*, a maceração interdigital, fissuras e descamação do estrato córneo, podem se tornar porta de entrada para infecções bacterianas secundárias e como reservatório de dermatófitos. Fármacos com amplo espectro são preferíveis por estes fatores, como o imidazol, que também exibe ação contra bactérias Gram-positivas (BRASIL, 2002; GUPTA et al., 2019b; RAJAGOPALAN et al., 2018).

O tratamento para *tinea unguium* se dá pelo uso oral de terbinafina ou griseofulvina por um período 3 a 4 meses, junto com um tratamento tópico (ASZ-SIGALL et al., 2017).

Em casos de *tinea capitis*, como regra geral, é preferível o tratamento sistêmico com griseofulvina ou terbinafina. Mesmo com melhoras visíveis, apenas com o tratamento tópico, as recidivas são altas. Como medida complementar, pode-se utilizar fármacos tópicos. O tratamento geralmente envolve 30 dias, ou até a cura (FULLER et al., 2014; HAY et al., 2017).

Em casos de recidivas e infecções crônicas de todas as tineas, o uso de agentes antimicóticos para um tratamento sistêmico pode ser prescrito pelo médico. O tratamento de dermatofitoses sistêmica pode ser a griseofulvina, terbinafina entre outros fármacos (NENOFF et al., 2015).

### 1.5. Mecanismos de resistência

A resistência microbiana frente a fármacos é algo comum e um dos principais problemas de saúde no mundo. Isto se dá pelo uso indiscriminado de fármacos antibacterianos e antifúngicos, por diagnósticos errôneos, falta de uma correta adesão ao tratamento, e pela seleção natural. Alguns dos mecanismos de resistência mais comuns encontrados em fungos são: aumento do efluxo do fármaco via bombas transmembranas, alterações no sítio ativo e diminuição da absorção do composto (GHANNOUM et al., 2016; KHURANA et al., 2019; WIEDERHOLD et al., 2017).

O primeiro caso de dermatófitos apresentando resistência frente a terbinafina foi publicado em 2003 por Mukherjee e colaboradores. Foi verificada a resistência em seis isolados clínicos de *T. rubrum* obtidos de um paciente recalcitrante à terapia oral por terbinafina (MUKHERJEE et al., 2003).

A resistência de cepas de *T. rubrum* frente a terbinafina se dá pela mutação do gene da esqualeno epoxidase. Esta enzima é necessária para a síntese do ergosterol, sendo inibida pela terbinafina. Com a alteração de um único aminoácido (posição L393F) o fármaco não se liga com a mesma afinidade, explicando assim essa resistência. Outras substituições de aminoácidos também são relatadas, como F397L, S395P, S443P e Q408L. Todas essas substituições não alteram a atividade enzimática da esqualeno epoxidase, somente a ligação à terbinafina (EBERT et al., 2020; HSIEH et al., 2019; OSBORNE et al., 2005).

Publicações mostram que substituições duplas na esqualeno epoxidase provocam resistência aos azóis (fluconazol, itraconazol). Kong e colaboradores verificaram que as substituições sozinhas de A448T e P397L em *Trichophyton indotineae* não provocaram aumento da CIM para fluconazol. Já as duas substituições simultâneas, geravam um aumento da CIM (64 µg/mL). Outra substituição dupla é F397L e Y394N que provocou aumento dos valores de CIM em *T. mentagrophytes*, tanto para itraconazol como para fluconazol (2 µg/mL e 64 µg/mL, respectivamente) (BURMESTER et al., 2020; GAURAV et al., 2021; KONG et al., 2021).

Outro mecanismo de resistência presente em cepas de *T. rubrum* é a expressão de genes (TruMDR1, TruMDR2) que codificam transportadores ABC que funcionam como bombas de efluxo. Na presença de fármacos como itraconazol, terbinafina, fluconazol e griseofulvina, observa-se um aumento da expressão destes genes (CERVELATTI et al., 2006; SACHELI et al., 2021).

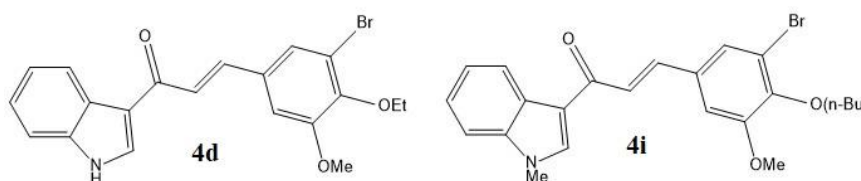
## 1.6. Chalconas e seus análogos

As chalconas são substâncias de estrutura relativamente simples, constituídas por dois anéis aromáticos (A e B) unidos por uma cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada. As chalconas possuem um esqueleto chamado de 1,3-diaril-2-propen-1-ona. Mais de 92.000 chalconas podem ser encontradas no SciFinder e mais de mil tem dados biológicos relatados no PubChem (ZHUANG et al., 2017).

As chalconas e seus análogos apresentam inúmeras atividade biológicas, incluindo: anti-inflamatória (GUAZELLI et al., 2021), antioxidante (OKOLO et al., 2021), anti-HIV (WU et al., 2017), antimalárica (QIN et al., 2020), antidepressiva (HUANG ZH et al., 2020), antiproliferativas (OUYANG et al., 2021), antibacteriana (XU et al., 2019), antimicobacteriana (CASTAÑO et al., 2019), antidiabética (MAHAPATRA et al., 2015), citotóxica (WANG et al., 2020), atividade neuroprotetora (SOOKNUAI et al., 2020), quimioprotetora (PANDA et al., 2016), antiviral incluindo anti- SARS-CoV-2 (DURAN et al., 2021; ELKHALIFA et al., 2021).

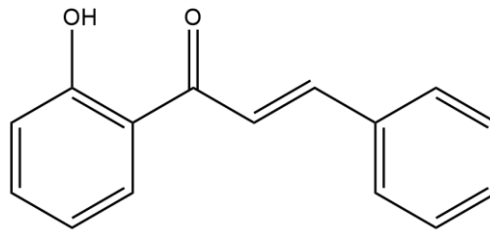
Um estudo recente conduzido por Mirzaei e colaboradores, investigou alguns derivados indólicos chalcônicos (indol como anel A) com potencial ação contra cepas de dermatófitos. Em especial o composto **4d** foi o mais potente, apresentando uma CIM de 0.25–2  $\mu\text{g/mL}$  contra *T. interdigitale*, *T. verucosum* e *M. fulvum*. Outro composto digno de nota foi o **4i**, apresentando uma CIM de 1–16  $\mu\text{g/mL}$  contra cepas de *T. mentagrophytes*, e *M. canis* (MIRZAEI et al., 2020).

**Figura 12.** Compostos com atividade antifúngica do trabalho de Mirzaei et al., 2020



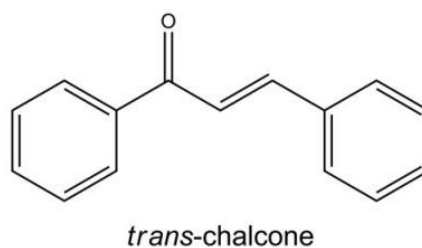
Bila e colaboradores, descreveram que a 2'-hidroxichalcona apresentou uma CIM de 7,8-15,6  $\mu\text{g/mL}$  contra cepas de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*, em crescimento planctônico. O biofilme em estágio inicial e maduro foram inibidos em 90% por esta chalcona, a uma concentração de 15,6  $\mu\text{g/mL}$  e 31,2  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (BILA et al., 2021).

**Figura 13.** Estrutura da 2'-hidroxichalcona do trabalho de Bila et al., 2021



No trabalho de Bitencourt et al., em 2013, foi observado que a *trans*-chalcona (Figura 14) apresentou CIM de 7,5 µg/mL contra cepa selvagem de *T. rubrum* (ATCC MYA3108) e 1,9 µg/mL contra cepa mutante  $\Delta$ TruMDR2. Esta cepa mutante tem uma mutação no gene TruMDR2, que como visto, codifica transportadores ABC atuando como bombas de efluxo. Neste mesmo trabalho, foi quantificado por espectrofotometria, o conteúdo de ergosterol proveniente de micélios das mesmas cepas de *T. rubrum*, após 48 horas de incubação com CIM e 0,5 da CIM da *trans*-chalcona. A presença da CIM (7,5 µg/mL para MYA3108, e 1,9 µg/mL para  $\Delta$ TruMDR2) foi capaz de reduzir em 100% o conteúdo de ergosterol, já na presença de 0,5 CIM, a redução foi de 74% e 77%, respectivamente. Por análise quantitativa RT-PCR, foi possível verificar que a *trans*-chalcona reprimiu os genes *FAS1* e *ERG6* em *T. rubrum* após 16 horas de crescimento. O gene *FAS1* está relacionado com a síntese de ácidos graxos e o gene *ERG6* com a síntese de ergosterol (BITENCOURT et al., 2013).

**Figura 14.** Estrutura da *trans*-chalcona estudada nos trabalhos de Bitencourt et al., (2013, 2019)

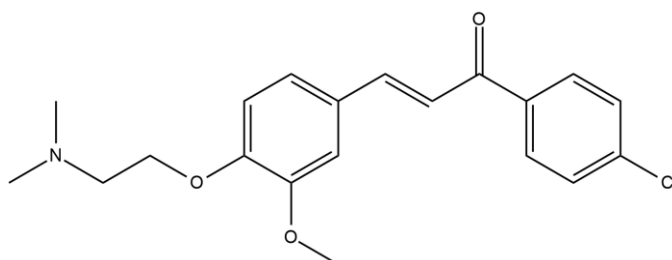


Um estudo conduzido por Bitencourt (2019) e colaboradores evidenciou o perfil de expressão gênica de *T. rubrum* frente à *trans*-chalcona. Quatro padrões transcricionais foram destacados: regulação negativa de genes referentes ao metabolismo de ácidos graxos e lipídios; modulação de rotas energéticas alternativas como  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos e ciclo de glioxilato; resposta ao estresse e via de integridade da parede celular. Este estudo auxiliou na

elucidação a respeito de como as chalconas agem nos dermatófitos pertencentes ao gênero *Trichophyton* (BITENCOURT et al., 2019).

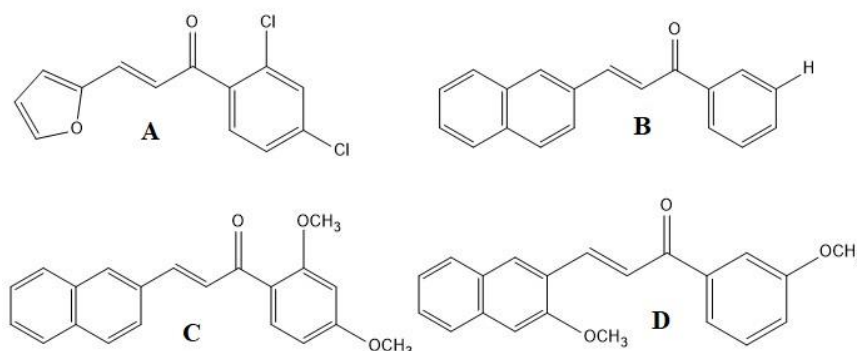
Outro estudo que evidencia o potencial antifúngico de derivados de chalconas é o realizado por Illicachi e colaboradores no ano de 2017. Neste estudo, uma chalcona (**4a**) apresentou valores de CIM e CFM de 31,25  $\mu\text{g/mL}$  contra cepas de *M. gypseum*, *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* (ILLICACHI et al., 2017).

**Figura 15.** Composto **4a** do trabalho de Illicachi et al., 2017



López e colaboradores (2001) testaram 41 chalconas em cepas de dermatófitos afim de elucidar sua capacidade de inibir, *in vitro*, a  $\beta(1,3)$ -glucano sintase e quitina sintase. Essas enzimas são responsáveis pela biossíntese de  $\beta(1,3)$ -glucano e quitina, respectivamente, dois dos principais polímeros presentes na parede celular dos fungos. Quatro compostos (**A**, **B**, **C** e **D**) foram os que apresentaram resultados promissores de CIM contra dermatófitos. As cepas utilizadas foram *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *E. floccosum*. O composto **A** apresentou valores de CIM variando de 6,25 – 12,5  $\mu\text{g/mL}$ , os demais apresentaram valores de  $> 50 \mu\text{g/mL}$  (LÓPEZ et al., 2001).

**Figura 16.** Compostos com atividade antifúngica do trabalho de López et al., 2008



## 2. JUSTIFICATIVA

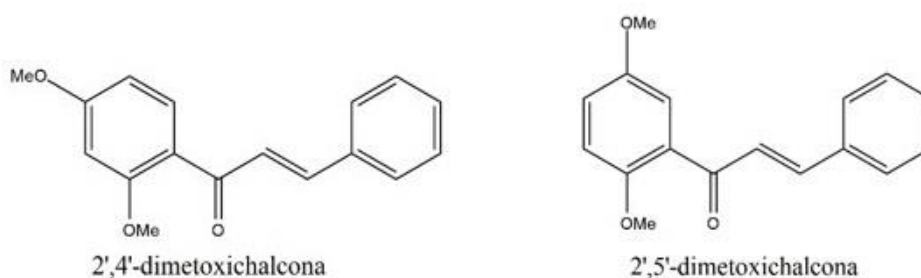
Os agentes antifúngicos são fármacos indispensáveis à manutenção da qualidade de vida. Inúmeras razões justificam a necessidade por novos fármacos: *(i)* A alta prevalência e distribuição mundial das dermatofitoses; *(ii)* Essas infecções causam muito desconforto visual ao paciente, gerando problemas de natureza psicológica; *(iii)* Por se tratar de infecções assintomáticas, na maioria das vezes, podem tornar-se crônicas; *(iv)* Envolvem tratamentos prolongados, que muitas vezes levam ao abandono pelo paciente; *(v)* Fármacos vigentes, principalmente os de via oral, provocam inúmeros efeitos adversos. Nesse contexto, compostos que tenham uma atividade potente e seletiva contra um agente causador de dermatofitose é de grande valor para o tratamento e a qualidade de vida dos acometidos.

No presente trabalho, foram selecionadas as espécies *M. canis*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *E. floccosum*, pois são prevalentes e relevantes. Além de, apresentar pelo menos uma espécie de cada gênero, para um trabalho mais amplo, para elucidar a ação das metoxichalconas nos três principais gêneros de dermatófitos.

Como parte das pesquisas realizadas no Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos – LAQ envolvendo a bioatividade de metoxichalconas realizados durante a vigência do Auxílio Regular Fapesp (21/04380-9), Bolsas de Iniciação Científica Fapesp (14/18577-5 e 16/08084-7), e Bolsa de Mestrado Fapesp (2017/09245-7), foram sintetizadas duas séries de metoxichalconas. Em uma das séries variou-se o número e a posição de metoxilas nos anéis A e B, sendo constatado que as modificações do anel A geraram metoxichalconas mais bioativas e promissoras. Esses análogos foram testados para elucidar suas atividades antibacterianas, antifúngicas e antiproliferativas.

Dentre essas substâncias, a 2',4'-dimetoxichalcona e a 2',5'-dimetoxichalcona (**Figura H.**) demonstraram atividade contra espécies de *Candida* sp. Os valores de CIM e CFM destes compostos podem ser visualizados na **Figura 7.** (MARQUES et al., 2020).

**Figura 17.** Estrutura da 2',4'-dimetoxichalcona e 2',5'-dimetoxichalcona



**Figura 18.** Valores de CIM e CFM do trabalho de Marques et al., 2020

Substância Agentes	2',4'- dimetoxichalcona		2',5'- dimetoxichalcona	
	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>C. albicans</i>	15,6	31,2	31,2	62,5
<i>C. glabrata</i>	15,6	15,6	31,2	62,5
<i>C. tropicalis</i>	62,5	62,5	31,2	62,5
<i>C. parapsilosis</i>	15,6	15,6	31,2	31,2
<i>C. krusei</i>	62,5	62,5	31,2	62,5

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CFM: Concentração Fungicida Mínima.

Esses resultados encorajaram a continuação dos estudos químicos e biológicos das substâncias 2',4'-dimetoxichalcona, e a 2',5'-dimetoxichalcona gerando outro trabalho realizado por Nascentes (2022). A primeira série (série **JA**) manteve-se as metoxilas nas posições 2' e 4', e variou-se os substituintes no anel B. A segunda série (série **JS**), manteve-se as metoxilas nas posições 2' e 5', e modificou-se os substituintes no anel B. Fazendo isso, buscou-se um aumento da bioatividade e conseqüentemente uma diminuição dos valores de CIM. O foco do trabalho de Nascentes foram os derivados da 2',4'-dimetoxichalcona (**JA-0**), destacando-se que as metoxichalconas não-substituída (**JA-0**), fluoradas (**JA-2F**, **JA-3F**, **JA-4F**), clorada (**JA-3Cl**) e metilada (**JA-3Me**) no anel B, apresentaram CIM igual ou inferior a 15,6 µg/mL contra a maioria das espécies clínicas avaliadas (NASCENTES, 2022).

A segunda série sintetizada no trabalho anterior (**JS**) ficou depositada na quimioteca do Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos (LAQ). Para a reativação do trabalho com a série **JS**, foram selecionados doze compostos a serem repurificados e analisados nesta atual dissertação.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi investigar a atividade antifúngica de doze análogos da 2',5'-dimetoxichalcona contra dermatófitos.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos doze análogos da 2',5'-dimetoxichalcona contra fungos filamentosos dermatófitos (*Trichophyton* spp., *Epidermophyton* spp. e *Microsporum* spp.), utilizando cepas de referência e isolados clínicos;
- Selecionar os análogos com menor valor de CIM dentre os doze derivados da 2',5'-dimetoxichalcona, para seguir os ensaios adicionais de atividade antifúngica e sua toxicidade;
- Avaliar a atividade antifúngica promovida pela combinação das metoxichalconas selecionadas com fármacos de referência no tratamento de dermatofitoses (terbinafina, fluconazol e itraconazol), por meio da metodologia de *checkerboard*;
- Avaliar a atividade antifúngica das metoxichalconas selecionadas na presença de ergosterol, para a investigação da ação sobre a membrana citoplasmática fúngica;
- Avaliar a atividade antifúngica das metoxichalconas selecionadas na presença de sorbitol, para a investigação da ação sobre a parede celular fúngica;
- Determinar a toxicidade das metoxichalconas selecionadas utilizando cultura de células de queratinócitos humanos (HaCaT);
- Determinar a toxicidade *in vivo* das metoxichalconas selecionadas contra larvas de *Tenebrio molitor*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Procedimentos químicos gerais

Os solventes e reagentes foram obtidos comercialmente da empresa Merck®. Para o monitoramento das reações foi utilizada placas de gel de sílica sob base de alumínio da marca Supelco®. As purificações foram realizadas por filtração, recristalização com misturas de etanol e água, cromatografia em gel de sílica (100–200 Mesh®, Merck®) e cromatografia por exclusão de tamanho (Sephadex LH-20, Merck®). O etanol foi utilizado como fase móvel em cromatografia por exclusão de tamanho. Para as técnicas cromatográficas utilizando-se gel de sílica, foram utilizadas diferentes combinações de solventes como fase móvel (hexano, acetato e acetona). Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H foram obtidos em espectrômetro Bruker Avance III 14.1 T 600MHz, usando acetona-*d*<sub>6</sub>, CDCl<sub>3</sub> ou DMSO-*d*<sub>6</sub> como solventes com TMS como referência interna. O ponto de fusão (mp) dos compostos foi medido em tubos capilares abertos utilizando o equipamento MS Tecnocon PFM-II.

### 4.2. Síntese

Todos os 12 compostos (**Figura 8.**) estudados neste trabalho já estavam previamente sintetizados e depositados na quimioteca do Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos (LAQ).

A síntese das dimetoxichalconas, foram realizadas por meio da reação de condensação aldólica de Claisen-Schmidt, entre a 2',5'-dimetoxiacetofenona (2 mmol) e respectivos benzaldeídos (2,2 mmol) utilizando uma solução etanólica (5 mL) como solvente, e adicionando gota a gota uma solução aquosa de KOH (60% m/v, 2 mL). As reações e análise prévia de pureza foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando luz ultravioleta com comprimentos de onda de 254 e 365 nm. Para revelação foi utilizada uma solução de anisaldeído sulfúrico. As purificações foram realizadas por cromatografia em coluna em gel de sílica utilizando misturas de hexano e acetato de etila como fase móvel, e cromatografia em coluna de permeação em gel Sephadex® LH-20 utilizando etanol como fase móvel.

### 4.3. Microrganismos

Foram utilizadas cepas de referência da American Type Culture Collection (ATCC) e Centraal bureau voor Schimmelcultures (CBS) e isolados clínicos provenientes de pacientes do Hospital de Base de São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil. Todas as culturas estão depositadas na micoteca do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São Paulo, Brasil. **Dermatófitos:** *Trichophyton rubrum* (CBS 118892), *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 2118), *Microsporum canis* (ATCC 11621) e isolados clínicos (TR6185, TM5419, MC7985, EF6068, EF6069). A origem dos isolados clínicos foi expressa na tabela 1. As linhagens utilizadas foram mantidas em ágar Sabouraud dextrose e incubadas 28 °C por até 15 dias.

**Tabela 1.** Origem dos isolados clínicos utilizados neste estudo

<b>Isolados</b>	<b>Origem</b>
<b>TM5419</b>	Unha de pés
<b>TR6185</b>	Pele de pés
<b>MC7985</b>	Couro cabeludo
<b>EF6068</b>	Unha de pés
<b>EF6069</b>	Pele de pés

TM: *T. mentagrophytes*; TR: *T. rubrum*; MC: *M. canis*; EF: *E. floccosum*.

### 4.4. Preparo dos inóculos e diluição dos compostos

Os inóculos foram preparados a partir de culturas com 14 dias de crescimento em ágar Batata Dextrose (PDA), incubadas a 28 °C para indução da esporulação. Após este período, as superfícies das colônias foram cobertas com 5 mL de salina estéril (0,85%), e raspadas com auxílio de ponteiros estéreis. A mistura foi então transferida para outro frasco para precipitação de estruturas pesadas. O sobrenadante contendo os conídios foi transferido para outro frasco estéril, homogeneizado em vórtex por 15 segundos. Os inóculos foram ajustados em espectrofotômetro (Bioespectro 1) com leituras a 530 nm, a fim de obter 68% a 70% de transmitância, seguido da diluição em meio RPMI-1640 na concentração de 1:50. O meio de cultura utilizado para a realização dos testes de sensibilidade e diluição das drogas sintéticas foi RPMI-1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio e acrescido de 2% de glicose, tamponado com MOPS 0,165M, pH 7,0. Os compostos foram preparados a partir de massa em

estoque utilizando DMSO para solubilização a no máximo 10%, preparados nas concentrações de 1.000 a 250 µg/mL.

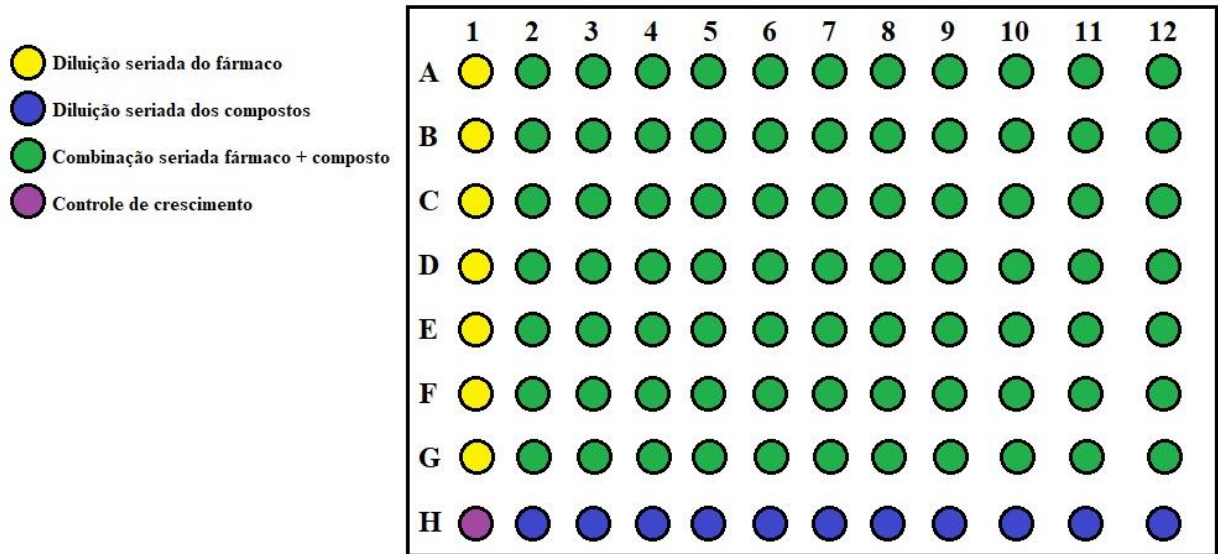
#### **4.5. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM)**

A atividade antifúngica dos análogos foi determinada de acordo com as recomendações do CLSI M38-A2 com modificações (CLSI, 2017). Foram pipetados 100 µL de meio RPMI-1640 em cada poço das placas de poliestireno de 96 poços, e mais 100 µL na coluna 1, servindo de controle de esterilidade. Na coluna 11 de cada placa foram pipetados e retirados 100 µL de uma solução de 20% de DMSO em RPMI-1640 para o controle do DMSO. Foi preparada a solução da substância com 2,0 mg de massa (aproximadamente), 0,2 mL de DMSO e 1,8 mL de RPMI-1640 a qual foi pipetada 100 µL na coluna 2, seguida por diluição seriada até a coluna 10, obtendo concentrações finais de 500 µg/mL a 1,9 µg/mL. Os inóculos foram preparados seguindo o item 4.4. Foram pipetados 100 µL do inóculo em todos os poços menos os da coluna 1 (controle de esterilidade do meio). A coluna 12 serviu como controle de crescimento. As placas foram incubadas a 35 °C por sete dias. A CIM foi determinada pela concentração capaz de inibir 100% do crescimento fúngico. Para a determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM), uma alíquota de cada poço da placa de ensaio de determinação da CIM que apresentou atividade antifúngica foi inserida em uma placa de Petri contendo o meio ágar Batata Dextrose (PDA). A CFM foi definida como a menor concentração da substância que não permitiu o desenvolvimento de colônias visíveis.

#### **4.6. Análise de efeito da combinação das dimetoxichalconas com fármacos antifúngicos pela metodologia de *checkerboard***

O efeito da combinação dos compostos **3F**, **4F** e **4CI** com os fármacos terbinafina, fluconazol e itraconazol contra *T. rubrum* (CBS 118892), foi avaliado por método de *checkerboard* em placa de microdiluição de 96 poços (Figura 20).

**Figura 19.** Fluxograma para avaliação de efeito da combinação das chalconas e fármacos antifúngicos



As combinações testadas foram **3F**, **4F** e **4Cl** (de 500 µg/mL a 1,9 µg/mL) com terbinafina (de 0,25 µg/mL a 0,003 µg/mL), fluconazol (de 32 µg/mL a 0,5 µg/mL) e itraconazol (de 8 µg/mL a 0,125 µg/mL). As placas foram incubadas a 35 °C por sete dias. Para determinar a interação entre os diferentes fármacos com os compostos foram calculados o índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) representado no esquema 1.

**Esquema 1.** Fórmula para o cálculo do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF)

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

Após o cálculo de ICIF a interação foi categorizada seguindo a classificação descrita por Kumar e colaboradores, onde:  $ICIF \leq 0,5$  para ação sinérgica;  $0,5 < ICIF \leq 1$  para ação aditiva;  $1 < ICIF \leq 2$  para indiferente e  $ICIF > 2$  para ação antagonista (KUMAR et al., 2012).

#### 4.7. Análise do modo de ação contra membrana e parede celular fúngica

Foi utilizado a mesma metodologia descrita no item 4.5., com a diferença que as linhas E, F, G e H foi utilizado meio suplementado com ergosterol (400 µg/mL) da Merck®, para avaliar ação na membrana citoplasmática, e sorbitol a 0,8 mol/L da Vetec®, para avaliação da

ação em parede celular fúngica. Como controles positivos foram utilizados anfotericina B no ensaio de ergosterol e caspofungina no ensaio de sorbitol. Os valores de CIM foram determinados visualmente como a concentração mais baixa que não produziu qualquer turbidez (CASTRO et al., 2015).

#### **4.8. Tempo de morte**

Ensaio de cinética de morte foi conduzido de acordo com método descrito por Klepser et al. (1998), com a linhagem TRCBS. Valores de  $2 \times$  CIM obtidos por microdiluição em caldo foram utilizados para este ensaio. O inóculo do dermatófito foi preparado a partir de cultura de 7 dias em Agar Dextrose (PDA) para indução da esporulação. Suspensões de 0,1 mL de conídios foram adicionadas em 4,9 mL de Caldo Sabouraud Dextrose (CSD) obtendo se uma suspensão final correspondente a  $0,4$  a  $5 \times 10^4$  unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Após a preparação dos inóculos, realizou-se diluição 1:1 (0,2 mL do composto com 0,2 mL do inóculo). Tubos contendo apenas inóculo foram incluídos para avaliação do controle de crescimento. Em tempos predeterminados (0, 8, 24, 48, 120 h) uma alíquota de 30  $\mu$ l foi retirada de cada amostra, semeada em placas de Agar Sabouraud Dextrose (ASD), com auxílio de alça Drigalski e incubadas a 35° C por 120 h. Posteriormente, seguiu-se com a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC). A porcentagem de inibição foi calculada por comparação com o controle de crescimento usando o método de contagem de colônias (KLEPSER et al., 1998).

#### **4.9. Ensaio de toxicidade contra queratinócitos**

Neste ensaio para a avaliação da citotoxicidade foi utilizada a linhagem celular de queratinócitos humanos, HaCaT do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ N° 0341). As células foram mantidas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C. A citotoxicidade das dimetoxichalconas foram avaliadas pelo reagente colorimétrico resazurina 0,01 % (PAVAN et al., 2010). Placas de microdiluição de 96 poços foram preparadas com  $1,0 \times 10^4$  células por poço e incubadas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h até a formação da monocamada celular. Foram avaliadas as concentrações de 3,9 a 62,5  $\mu$ g/mL dos compostos **3F**, **4F** e **4Cl**, as quais foram preparadas a partir de diluições seriadas em meio de cultura. Além disso, foi utilizado DMSO 100% como controle positivo. As células foram incubadas com os tratamentos e após 24 h de

incubação à 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>, foram adicionados 100 µL da solução de resazurina 0,01% em meio DMEM, incubado por 4 horas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (Biotek-Epoch 2) com comprimento de onda de 570 e 600 nm. Os ensaios foram realizados em réplicas de experimentos independentes. A viabilidade celular foi calculada com base nos valores de absorvância, tendo o controle negativo considerado como 100% de células viáveis. A confecção dos gráficos foi realizada por meio do software GraphPad Prism 9 (BILA et al., 2021).

#### **4.10. Toxicidade contra larvas de *Tenebrio molitor***

Foram selecionadas 10 larvas de *Tenebrio molitor* com peso de 100–200 mg, sem alterações de cor (manchas) para cada condição. As larvas foram tratadas com 10 uL dos compostos e incubadas a 37°C, com alimento e protegidas da luz. As concentrações utilizadas dos compostos foram 7,8 µg/mL, 62,5 µg/mL, 125 µg/mL, 625 µg/mL, 1.250 µg/mL. Já para o controle de sobrevivência foi utilizado PBS, como controle de tratamento a terbinafina nas concentrações de 125 µg/mL e 625 µg/mL e como controle solvente, DMSO a 3%. A sobrevivência das larvas foi avaliada por 10 dias. Foram avaliadas contabilizando o número de mortes para traçar a curva de sobrevivência (larva morta: sem resposta ao toque e mielinizadas). Os experimentos foram realizados em experimentos independentes. A confecção dos gráficos foi realizada por meio do software GraphPad Prism 9 (DE SOUZA et al., 2015; DE SOUZA et al., 2018).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

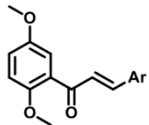
### 5.1. Metoxichalconas

Todos os análogos foram sintetizados e purificados no Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos (LAQ) (IBILCE, Unesp São José do Rio Preto), sob orientação do Prof. Dr. Luis Octavio Regasini. A identidade dos compostos foi avaliada por meio da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) permitindo a confirmação de sua estrutura.

Todos os 12 compostos (**Figura 20**) estudados neste trabalho já estavam previamente sintetizados e depositados na quimioteca do Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos (LAQ).

A síntese das metoxichalconas, foi realizada por meio da reação de condensação aldólica de Claisen-Schmidt, entre a 2',5'-dimetoxiacetofenona e derivados benzaldeídicos em meio básico, e utilizando etanol como solvente. As reações e análise prévia de pureza foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando luz ultravioleta com comprimentos de onda de 254 e 365 nm. Para revelação foi utilizada solução de anisaldeído sulfúrico. As purificações foram realizadas por cromatografia em coluna em gel de sílica utilizando misturas de hexano e acetato de etila como fase móvel, ou cromatografia em coluna de permeação em gel Sephadex® LH-20 utilizando etanol como fase móvel. As estruturas das dimetoxichalconas foram confirmadas por análise de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogenio (RMN  $^1\text{H}$ ) (APÊNDICE 1).

**Figura 20.** Estrutura dos 12 análogos derivados da 2',5'-dimetoxichalcona da quimioteca do Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos (LAQ).



Código	Ar
<b>2Cl</b>	2-clorofenila
<b>3Cl</b>	3-clorofenila
<b>4Cl</b>	4-clorofenila
<b>2Br</b>	2-bromofenila
<b>3Br</b>	3-bromofenila
<b>4Br</b>	4-bromofenila
<b>2F</b>	2-fluorfenila
<b>3F</b>	3-fluorfenila
<b>4F</b>	4-fluorfenila
<b>3CF<sub>3</sub></b>	3-trifluorometilfenila
<b>4CF<sub>3</sub></b>	4-trifluorometilfenila
<b>4OCF<sub>3</sub></b>	4-trifluorometoxifenila

## 5.2. Atividade antifúngica das metoxichalconas contra dermatófitos

Os ensaios de susceptibilidade, atividade sinérgica com fármacos de referência, complexação com ergosterol exógeno, sorbitol e tempo de morte, foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP, sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida.

Os ensaios de susceptibilidade indicaram a potência antifúngica das metoxichalconas por meio de valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM), os quais foram expressos em µg/mL.

A determinação da CIM foi realizada pela técnica de diluição em microplaca de acordo com o protocolo descrito no documento M38-A2 (para fungos filamentosos), com pequenas modificações. A terbinafina foi utilizada como fármaco antifúngico de referência.

Foram considerados valores de CIM promissores aqueles iguais ou inferiores a 31,5 µg/mL, levando-se em conta os trabalhos anteriores do grupo, publicações e documentos padronizados (CLSI M38-A2). Algumas correlações foram realizadas, baseadas nos valores de CIM e CFM (**Tabela 2**). Com relação aos grupos halogenados, os análogos fluorados

apresentaram menores valores de CIM quando comparados aos demais, sendo que os compostos **3F** e **4F** os únicos que apresentaram CIM de 7,8 µg/mL.

Outro composto digno de nota foi o **4Cl**, apresentando valores de CIM de 15,6 µg/mL contra quatro cepas testadas: *T. rubrum* (CBS), *T. rubrum* isolado clínico (TR6185), *T. mentagrophytes* isolado clínico (TM5419) e *M. canis* (MCATCC).

Os compostos trifluorados apresentaram valores de CIM de 31,5 µg/mL contra as cepas: *T. rubrum* isolado clínico (TR6185), *T. mentagrophytes* isolado clínico (TM5419), *M. canis* (MCATCC) e *M. canis* isolado clínico (MC7985). Nenhum destes compostos apresentaram valores menores que 31,5 µg/mL.

Levando-se em conta a posição dos substituintes, os compostos com substituintes nas posições *meta* e *para* apresentaram menores valores do que em *orto*. Com exceção do **2F** que apresentou CIM de 31,5µg/mL contra as cepas de *T. rubrum* CBS e *T. rubrum* isolado clínico.

As cepas de referência de *T. rubrum* (CBS) e *M. canis* (ATCC) foram mais sensíveis às metoxichalconas do que os isolados clínicos. Isso demonstra uma menor susceptibilidade de cepas da comunidade, provavelmente devido ao abandono de tratamento, tratamento incompleto e negligente, entre outros fatores já discutidos no atual trabalho. A cepa de referência de *T. mentagrophytes* (ATCC) foi mais resistente do que a cepa proveniente de isolado clínico.

Os compostos foram menos eficientes contra a cepa de *E. floccosum* do que as demais. Os únicos compostos a apresentarem valores iguais ou inferiores à 31,5 µg/mL contra as cepas de *E. floccosum* foram o **4F** e **3F** apresentando CIM de 15,6 µg/mL e o **4Cl** com CIM de 31,5 µg/mL.

Foram selecionados os compostos **4Cl**, **3F** e **4F** para prosseguir com os ensaios de sorbitol e ergosterol, para análise de modo de ação; *checkerboard* para estudo de sinergismo com fármacos de referência; e ensaios de toxicidade em HaCaT, e *Tenebrio molitor*.

**Tabela 2.** Atividade antifúngica de metoxichalconas expressa em valores de CIM e CFM ( $\mu\text{g/mL}$ ) contra cepas de dermatófitos

Composto	TRCBS		TR6185		TMATCC		TM5419		MCATCC		MC7985		EF6068		EF6069	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
<b>2Cl</b>	62,5	62,5	62,5	>62,5	62,5	>62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5
<b>3Cl</b>	62,5	>62,5	62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5
<b>4Cl</b>	15,6	>62,5	15,6	>62,5	62,5	>62,5	15,6	62,5	15,6	31,5	31,5	>62,5	31,5	>62,5	31,5	>62,5
<b>2Br</b>	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5
<b>3Br</b>	31,5	>62,5	31,5	>62,5	>62,5	>62,5	15,6	31,5	15,6	15,6	15,6	62,5	62,5	>62,5	62,5	>62,5
<b>4Br</b>	>62,5	>62,5	15,6	>62,5	>62,5	>62,5	31,5	62,5	15,6	15,6	62,5	>62,5	62,5	>62,5	62,5	>62,5
<b>2F</b>	31,5	62,5	31,5	>62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	31,5	62,5	62,5	62,5	>62,5	62,5	>62,5
<b>3F</b>	7,8	62,5	7,8	>62,5	31,5	62,5	15,6	31,5	7,8	15,6	7,8	15,6	31,5	>62,5	15,6	>62,5
<b>4F</b>	15,6	>62,5	62,5	>62,5	31,5	>62,5	7,8	31,5	15,6	15,6	31,5	31,5	31,5	>62,5	15,6	>62,5
<b>3CF<sub>3</sub></b>	62,5	>62,5	31,5	>62,5	62,5	>62,5	31,5	31,5	31,5	62,5	31,5	62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5
<b>4CF<sub>3</sub></b>	62,5	>62,5	>62,5	>62,5	62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5
<b>4OCF<sub>3</sub></b>	31,5	31,5	31,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	31,5	31,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5
<b>Terb</b>	0,01	NF	0,01	NF	0,03	NF	0,25	NF	0,01	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF

TRCBS = *Trichophyton rubrum* cepa CBS 118892; TR6185 = isolado clínico de *Trichophyton rubrum*; TMATCC = *Trichophyton mentagrophytes* cepa ATCC 2118; TM5419 = isolado clínico de *Trichophyton mentagrophytes*; MCATCC = *Microsporium canis* cepa ATCC 11621; MC7985 = isolado clínico de *Microsporium canis*; EF6068 = isolado clínico de *Epidermophyton floccosum*; EF6069 = isolado clínico de *Epidermophyton floccosum*; CIM = concentração inibitória mínima; CFM = concentração fungicida mínima; Terb = terbinafina; NF = não feito

### 5.3. Atividade antifúngica da combinação de metoxichalconas com fármacos antifúngicos

A associação de fármacos é uma estratégia muito utilizada para aumentar a eficiência do tratamento antimicrobiano, visando sempre diminuir a toxicidade e frear o surgimento de resistência por parte dos agentes etiológicos.

Foi realizado o experimento de *checkerboard* com a finalidade de evidenciar o efeito sinérgico entre os compostos **3F**, **4F** e **4Cl**, com fármacos antifúngicos de referência no tratamento das dermatofitoses (terbinafina, fluconazol e itraconazol). Este efeito foi analisado pelo cálculo do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF), que é a adição das razões dos fármacos e das metoxichalconas (CIM no mix / CIM isolado), a fórmula se encontra no **Esquema 1**.

Após o cálculo de ICIF a interação foi avaliada seguindo a classificação descrita por Kumar e colaboradores, onde:  $ICIF \leq 0,5$  para ação sinérgica;  $0,5 < ICIF \leq 1$  para ação aditiva;  $1 < ICIF \leq 2$  para indiferente e  $ICIF > 2$  para ação antagônica (KUMAR et al., 2012).

**Tabela 3.** Efeito sinérgico entre **3F** e diferentes fármacos contra *Trichophyton rubrum* (TRCBS 118892)

Fármacos	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )				ICIF	Modo de interação
	Fármaco	<b>3F</b>	Fármaco no mix	<b>3F no mix</b>		
<b>Terbinafina</b>	0,25	7,8	0,0039	3,9	0,515	Aditivo
<b>Itraconazol</b>	0,5	7,8	0,125	3,9	0,75	Aditivo
<b>Fluconazol</b>	8	7,8	1	3,9	0,625	Aditivo

**Tabela 4.** Efeito sinérgico entre **4F** e diferentes fármacos contra *Trichophyton rubrum* (TRCBS 118892)

Fármacos	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )				ICIF	Modo de interação
	Fármaco	<b>4F</b>	Fármaco no mix	<b>4F no mix</b>		
<b>Terbinafina</b>	0,25	15,6	0,031	7,8	0,624	Aditivo
<b>Itraconazol</b>	0,5	15,6	0,25	0,06	0,503	Aditivo
<b>Fluconazol</b>	8	15,6	0,5	15,6	1,06	Indiferente

**Tabela 5.** Efeito sinérgico entre **4Cl** e diferentes fármacos contra *Trichophyton rubrum* (TRCBS 118892)

Fármacos	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )				ICIF	Modo de interação
	Fármaco	4Cl	Fármaco no mix	4Cl no mix		
<b>Terbinafina</b>	0,25	15,6	0,015	7,8	0,56	Aditivo
<b>Itraconazol</b>	0,5	15,6	0,25	0,48	0,53	Aditivo
<b>Fluconazol</b>	8	15,6	2	3,9	0,5	Aditivo

O composto **3F** apresentou ação aditiva com os três fármacos avaliados, sendo em conjunto com a terbinafina o ICIF mais baixo (0,515). Apresentou uma diminuição da concentração inibitória em 50% nos três casos (**Tabela 3**). O composto **4F** apresentou ação aditiva com terbinafina (ICIF = 0,624) e itraconazol (ICIF = 0,503), e ação indiferente com o fármaco fluconazol (ICIF = 1,06) (**Tabela 4**). O composto **4Cl** mostrou ação aditiva com os três fármacos, apresentando o menor ICIF em combinação com o fluconazol (0,5) (**Tabela 5**).

O composto **3F** possui ICIF mais baixo em associação com a terbinafina, o **4F** com o itraconazol e o **4Cl** com o fluconazol, e nenhum composto apresentou ação sinérgica. Estes dados mostram que a variação dos halogênios não interferiu na ação sinérgica com os fármacos testados.

#### 5.4. Ação das metoxichalconas em membrana citoplasmática e parede celular fúngica

Para analisar o modo de ação dos compostos selecionados (**3F**, **4F** e **4Cl**) foram realizados ensaios visando elucidar sua ação em membrana e parede fúngica. Estes ensaios ocorrem por meio da suplementação do meio de cultura RPMI com ergosterol e sorbitol. Se uma substância atuar em enzimas da biossíntese de ergosterol, ou no próprio ergosterol, como no caso do fármaco anfotericina B, em um meio de cultura suplementado com o ergosterol, ocorre um aumento do valor de CIM. Do mesmo modo, se uma substância atuar na parede celular fúngica (como por exemplo a caspofungina), a presença de sorbitol também leva ao aumento da CIM (STONE et al., 2016).

A membrana dos fungos apresenta uma alta complexidade, sendo formada por fosfolipídios, proteínas e ergosterol. Por ser um componente da membrana celular dos fungos e não estar presente nas membranas celulares de animais, o ergosterol torna-se um alvo para fármacos antifúngicos com ação seletiva (BIERNASIUK et al., 2022; JORDÁ et al., 2020).

Na presença de ergosterol, os três compostos (**3F**, **4F** e **4Cl**) apresentaram aumento da CIM em 16 vezes em relação ao meio não suplementado (Tabela 6). O fármaco anfotericina B

também teve um aumento esperado (16 vezes), já que se liga ao ergosterol presente na membrana citoplasmática fúngica, levando a formação de poros e extravasamento de íons e conseqüentemente à morte celular. Esses resultados demonstram que o modo de ação dessas chalconas está relacionado a uma complexação com o ergosterol, e/ou danos causados à membrana (BIERNASIUK et al., 2022; STONE et al., 2016).

**Tabela 6.** Valores de CIM, expressos em  $\mu\text{g/mL}$  das metoxichalconas na presença e ausência de ergosterol

Substâncias	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	RPMI sem suplementação	RPMI Suplementado
<b>3F</b>	7,8	125
<b>4F</b>	15,6	250
<b>4Cl</b>	15,6	500
<b>Anfotericina B</b>	1	16

O sorbitol é um protetor osmótico de células fúngicas quando estas apresentam dano na parede celular. Dessa forma, substâncias que atuam como disruptoras da parede celular exibem potência antifúngica reduzida na presença de sorbitol. Este efeito pode ser detectado pelo aumento dos valores de CIM (CASTRO et al., 2015; JOTHI et al., 2022).

O  $\beta$ -(1,3)-D-glucano é um dos principais polissacarídeos presente na parede celular fúngica, e o fármaco caspofungina inibe sua produção (inibindo a enzima  $\beta$ -(1,3)-D-glucano-sintase), levando à lise e morte celular. O aumento da CIM do fármaco caspofungina era esperado, porém os compostos **3F**, **4F** e **4Cl** não tiveram diferença nos valores de CIM. Isso indica que o mecanismo de ação destes compostos não envolve a parede celular fúngica (HASHEMIAN et al., 2020)

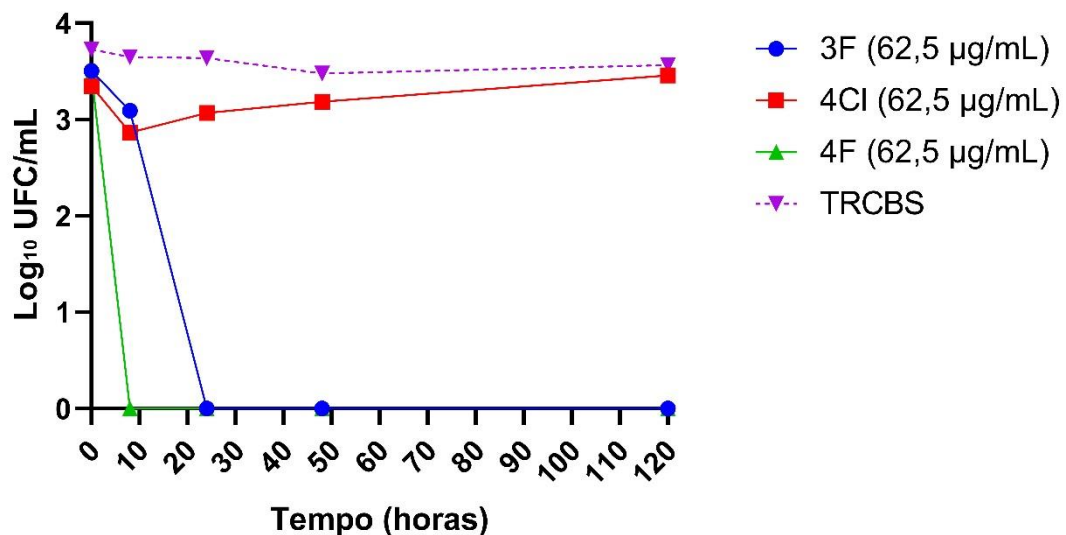
**Tabela 7.** Valores de CIM expressos em ( $\mu\text{g/mL}$ ) das metoxichalconas na presença e ausência de sorbitol

Substâncias	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	RPMI sem suplementação	RPMI Suplementado
<b>3F</b>	7,8	7,8
<b>4F</b>	15,6	15,6
<b>4Cl</b>	15,6	15,6
<b>Caspofungina</b>	2	32

### 5.5. Tempo de morte de *Trichophyton rubrum* (CBS)

O ensaio de tempo de morte foi conduzido por um período de 120 horas. A curva de morte dos compostos contra cepa de *T. rubrum* CBS pode ser visualizada na **Figura 21**. Foi utilizada a concentração de  $62,5 \mu\text{g/mL}$  para as três chalconas, e a redução máxima foi observada pelo composto **4F** em 8 horas, com taxa de inibição de 100%.

**Figura 21.** Tempo de morte de *Trichophyton rubrum* CBS118892 na presença de **3F**, **4F** e **4Cl**



O composto **4F** inibiu 100% do crescimento em 8 horas. O composto **3F** apresentou inibição de 100% em 24 horas, e o composto **4Cl** não inibiu o crescimento de *T. rubrum*, mesmo no tempo máximo de 120 horas. Estes resultados indicam que os compostos fluorados (**3F** e **4F**) apresentaram efeito fungicida contra cepa CBS de *T. rubrum*. O composto **4Cl**, mesmo exibindo CIM de  $15,6 \mu\text{g/mL}$  frente a mesma cepa, exibiu um efeito fungistático. Estes

resultados levam a conclusão de que o átomo de flúor é um substituinte com contribuição farmacofórica para a ação fungicida (LEWIS et al., 2008).

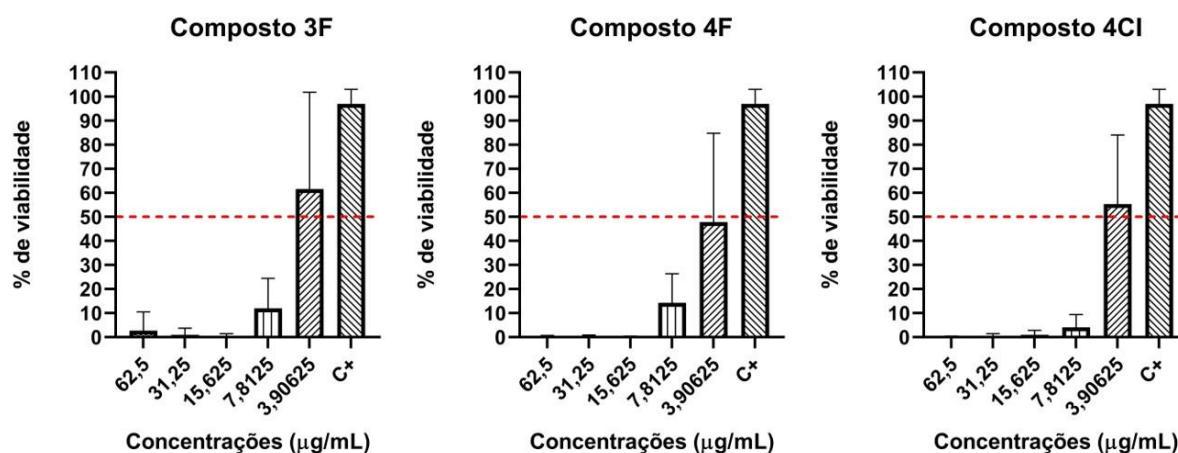
### 5.6. Ensaios de toxicidade contra queratinócitos humanos (HaCaT)

Os ensaios para avaliação da toxicidade *in vitro* e *in vivo* foram realizados no Núcleo de Proteômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Câmpus de Araraquara (UNESP) sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida.

O ensaio de citotoxicidade foi realizado em queratinócitos de pele humana (HaCaT), uma linhagem muito utilizada em trabalhos científicos com dermatófitos, já que acometem, principalmente a pele (BILA et al., 2021; DENG et al., 2019; HUANG M et al., 2020).

Os três compostos foram testados em concentrações que variaram de 3,9 a 62,5  $\mu\text{g/mL}$ , e apresentaram redução da viabilidade celular de HaCaT em 50% na concentração de 3,9  $\mu\text{g/mL}$ , com pequenas variações (Figura 22).

**Figura 22.** Viabilidade das células HaCaT frente aos compostos **3F**, **4F** e **4CI**



Os três compostos apresentaram um perfil semelhante contra as células HaCaT, indicando uma certa toxicidade, independente do grupo halogênio. Também foi calculado o Índice de Seletividade (IS), que mostra o quão seletivo o composto é para inibir as células fúngicas e não ocasionar danos as células humanas (Tabela 8). O cálculo do IS se dá pela razão da concentração inibitória 50% ( $CI_{50}$ ) e a concentração inibitória mínima (CIM) (RADHA et al., 2021; SOARES et al., 2014).

O IS é um parâmetro importante para o desenvolvimento de novos fármacos, já que relaciona segurança e potência de um determinado composto. Quanto maior ou igual a 10 o IS

for, mais seletivo é o composto, quanto menor que 10 o IS, menor sua seletividade. Todos os compostos testados apresentaram IS menor que 0,5, indicando uma baixa seletividade dos mesmos (JASKIEWICZ et al., 2019).

**Tabela 8.** Toxicidade contra queratinócitos (HaCaT) e índice de seletividade (IS)

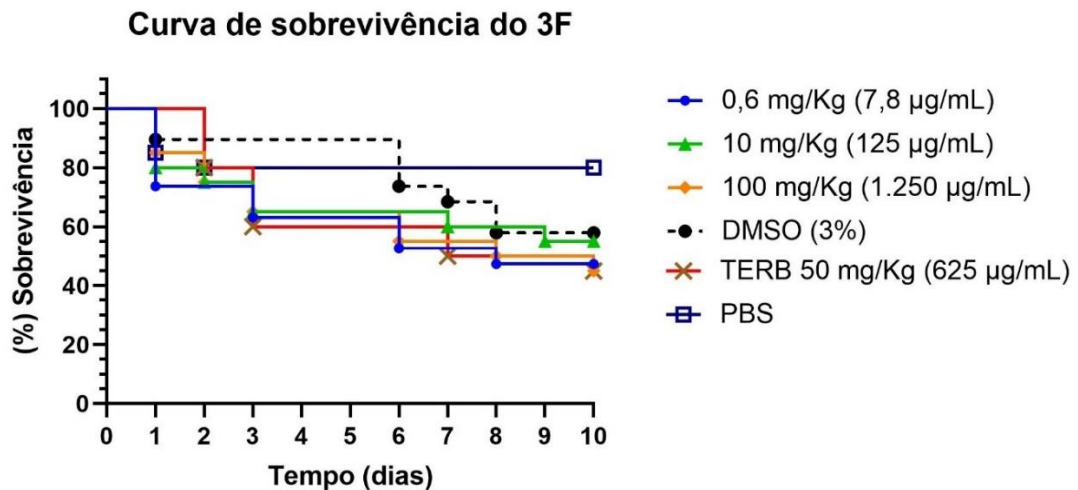
Compostos	CI <sub>50</sub> HaCaT	CIM TM	IS	CIM TR	IS	CIM MC	IS	CIM EF	IS
<b>3F</b>	3,9	31,5	0,12	7,8	0,5	7,8	0,5	15,6	0,25
<b>4F</b>	3,9	31,5	0,12	15,6	0,25	15,6	0,25	15,6	0,25
<b>4Cl</b>	3,9	62,5	0,06	15,6	0,25	15,6	0,25	31,5	0,12

TM = *T. mentagrophytes* ATCC 2118; TR = *T. rubrum* CBS 118892; MC = *M. canis* ATCC 11621; EF = *E. floccosum* EF6069

### 5.7. Toxicidade contra larvas de *Tenebrio molitor*

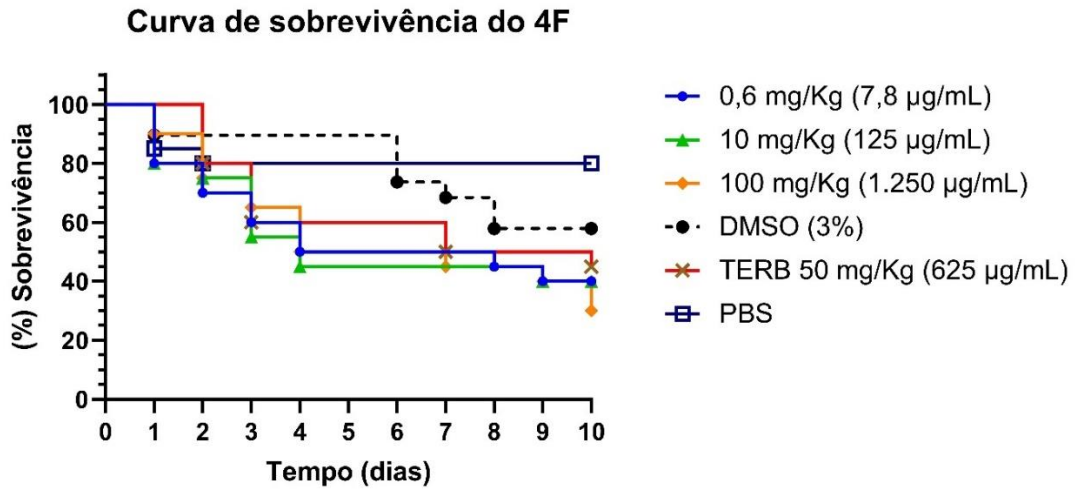
O ensaio de toxicidade *in vivo* foi realizado em larvas de *Tenebrio molitor*, onde os compostos selecionados foram testados nas concentrações de 7,8 µg/mL a 1.250 µg/mL por 10 dias.

**Figura 23.** Toxicidade da chalcona **3F** contra larvas de *Tenebrio molitor*



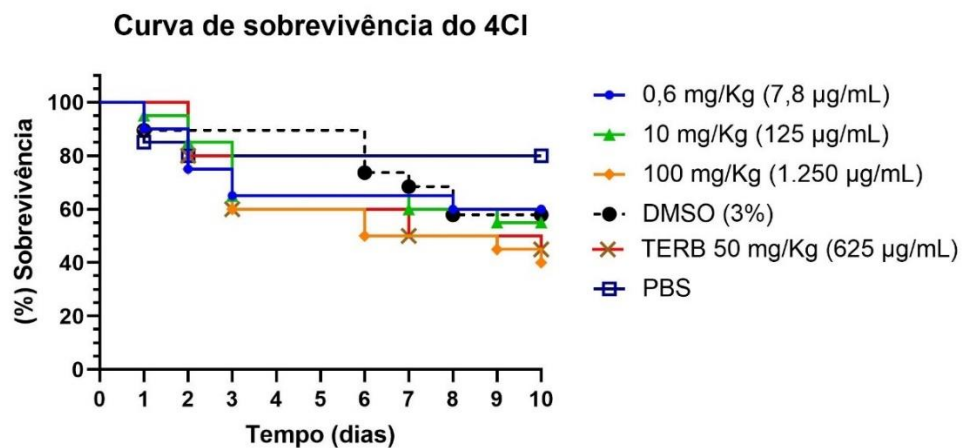
DMSO = dimetilsulfóxido; TERB = Terbinafina

**Figura 24.** Toxicidade da chalcona **4F** contra larvas de *Tenebrio molitor*



DMSO = dimetilsulfóxido; TERB = Terbinafina

**Figura 25.** Toxicidade da chalcona **4Cl** contra larvas de *Tenebrio molitor*



DMSO = dimetilsulfóxido; TERB = Terbinafina

A utilização de modelos experimentais alternativos aos de mamíferos vem sendo amplamente explorado, pelo seu baixo custo, manejo e questões éticas. Os modelos invertebrados para testes *in vivo* são de fácil comercialização e cultivo nos laboratórios. Modelos como o de *Galleria mellonella*, *Caenorhabditis elegans* e *Tenebrio molitor* já são consolidados para testes de toxicidade *in vivo* (DE SOUZA et al., 2018; DINH et al., 2021; GIUNTI et al., 2021; LOZOYA-PÉREZ et al., 2021).

O ensaio em larvas de *T. molitor* mostrou uma taxa de sobrevivência após 10 dias variando de 30 a 60% para os compostos, 80% para o PBS (controle de crescimento), 45% para a terbinafina (625 µg/mL) e 60% para o DMSO utilizado na solubilização dos compostos.

A taxa de sobrevivência das larvas para o composto **3F** foi de 45 a 55%, para o **4F** foi de 30 a 40%, e para o composto **4Cl**, de 40 a 60%. Podemos concluir que o composto **4F** apresentou uma maior toxicidade *in vivo* em relação aos demais. Porém, todos os três compostos selecionados apresentaram uma toxicidade próxima à da terbinafina (45%), indicando uma toxicidade similar com a de um fármaco de referência no tratamento das dermatofitoses. Além disso, se consideramos a toxicidade provocada pelo próprio DMSO, a porcentagem de sobrevivência dos compostos aumentaria consideravelmente.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados da atividade antifúngica dos doze compostos testados são promissores, levando a seleção de um três mais potentes (**3F**, **4F** e **4Cl**). No ensaio para avaliar a ação aditiva com os fármacos terbinafina, fluconazol e itraconazol, os compostos selecionados demonstram ação aditiva, somente o **4F** apresenta ação indiferente com o fluconazol. Quanto ao tempo de morte, os compostos fluorados **4F** e **3F** apresentam ação fungicida, inibindo em 100% o crescimento de *T. rubrum* em 8 horas e 24 horas, respectivamente. O composto **4Cl** apresenta ação fungistática, e não apresenta efeito letal contra *T. rubrum*. As chalconas selecionadas apresentam ação em membrana citoplasmática e não agem em parede celular fúngica.

Os resultados de toxicidade contra queratinócitos humanos (HaCaT) demonstram uma alta toxicidade e baixa seletividade dos compostos selecionados. O ensaio *in vivo* demonstra uma menor toxicidade, similar ao fármaco de referência no tratamento de dermatofitoses, terbinafina. Este fato elucidou uma possível toxicidade aceitável em um organismo vivo, aumentando as chances de algum destes compostos se tornar algum fármaco no auxílio do tratamento das dermatofitoses. É conclusivo que se torna necessário novos ensaios de toxicidade em outros modelos, tanto *in vitro* como *in vivo*, para elucidar a segurança destes compostos. Além de novos ensaios para investigar e esclarecer o mecanismo de ação destas dimetoxichalconas.

## REFERÊNCIAS

- ABASTABAR, Mahdi et al. In vitro activities of 15 antifungal drugs against a large collection of clinical isolates of *Microsporum canis*. **Mycoses**, Iran, v. 62, p. 1069–1078, 2019.
- ALEMAYEHU, Alem et al. Prevalence and Etiologic Agents of Dermatophytosis among Primary School Children in Harari Regional State, Ethiopia. **Journal of Mycology**, Ethiopia, v. 2016, p. 1-5, 2016.
- ALI MALAYERI, Fardim et al. Antifungal agents: polyene, azole, antimetabolite, other and future agents. **Journal of Basic Research in Medical Sciences**, Iran, v. 5, p. 48-55, 2018.
- ALMEIDA, Lívia et al. Resposta in vitro de fungos agentes de micoses cutâneas frente aos antifúngicos sistêmicos mais utilizados na dermatologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, p. 249–255, 2009.
- ARAÚJO, Magnollya et al. Pés de risco para o desenvolvimento de ulcerações e amputações em diabéticos. **Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste**, Brazil, v. 10, p.19-28, 2009.
- ARAYA, Shambel et al. Epidemiology of Dermatophyte and Non-Dermatophyte Fungi Infection in Ethiopia. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, Ethiopia, v. 13, p. 291-297, 2020.
- ARENAS, Roberto et al. Onicomicose na infância: uma perspectiva atual com ênfase na revisão do tratamento. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Brasil, v. 79, p. 225-232, 2004.
- BALDO, Aline et al. Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes. **Mycoses**, Belgium, v. 55, p. 218–223, 2011.
- BARBEDO, Leonardo et al. Candidíase. **Brazilian Journal of Sexually Transmitted Diseases**, Brasil, v. 22, p. 22-38, 2010.
- BARROSO, L. C. **Dermatofitoses em pessoas atendidas em um serviço público de micologia de Manaus/AM: Epidemiologia e possíveis fontes de infecção**. 2017. 84 p. Dissertação (Mestrado em Condições de Vida e Situações de Saúde na Amazônia) - Instituto Leônidas e Maria Deane, Manaus, 2017.
- BAUMGARDNER, Dennis et al. Fungal Infections From Human and Animal Contact. **Journal of Patient-Centered Research and Reviews**, v. 4, p. 78-89, 2017.
- BAVEJA, Sukriti et al. Copper-impregnated socks: A novel therapeutic option for combating occupational dermatophytosis. **Medical Journal Armed Forces India**, India, v. 77, p. 437-443, 2021.

BIERNASIUK, Anna et al. Clove Essential Oil and Its Main Constituent, Eugenol, as Potential Natural Antifungals against *Candida* spp. Alone or in Combination with Other Antimycotics Due to Synergistic Interactions. **Molecules**, v. 28, p. 215, 2022.

BILA, Níura et al. 2-Hydroxychalcone as a Potent Compound and Photosensitizer Against Dermatophyte Biofilms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Brasil, v. 11, 2021

BONTEMS, Olympia et al. Epidemiology of Dermatophytoses in Switzerland According to a Survey of Dermatophytes Isolated in Lausanne between 2001 and 2018. **Journal of Fungi**, Switzerland, v. 6, 2020

BRILHANTE, Raimunda et al. Tinea capitis in dermatology center in the city of Fortaleza, Brazil: The role of *Trichophyton tonsurans*. **International Journal of Dermatology**, v. 43, p. 575-579, 2004.

BURMESTER, Anke et al. Indian Trichophyton mentagrophytes squalene epoxidase erg1 double mutants show high proportion of combined fluconazole and terbinafine resistance. **Mycoses**, v. 63, p. 1175-1180, 2020.

CASTAÑO, Lina Fernanda et al. New chalcone-sulfonamide hybrids exhibiting anticancer and antituberculosis activity. **European journal of Medicinal Chemistry**, v. 176. P. 50-60, 2019.

CASTRO, Ricardo Dias et al. Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the oral cavity: an in vitro study. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, p. 417-423, 2015.

CERVELATTI, Eliane et al. Molecular cloning and characterization of a novel ABC transporter gene in the human pathogen *Trichoyton rubrum*. **Medical Mycology**, v. 44, p. 141-147, 2006.

COSTA, Milce et al. Epidemiologia e etiologia das dermatofitoses em Goiânia, GO, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina TYropical**, Uberaba, v. 35, p. 19-22, 2002.

COSTA-ORLANDI, Caroline Barcelos et al. Incorporation of Nonyl Nanostructured Lipid Systems : Effective Alternative for Maintaining Anti-Dermatophytic and Antibiofilm Activities and Reducing Toxicity At High Concentrations. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020.

CUNHA, Geanne M et al. Cytotoxic activity of chalcones isolated from *Lonchocarpus sericeus* (pocr.) kunth. **Phytotherapy Research**, v.17, p. 155-159, 2003.

DALLA LANA, Daiane Flores et al. Dermatofitoses: agentes etiológicos, formas clínicas, terapêutica e novas perspectivas de tratamento. **Clinical and Biomedical Research**, vol. 36, p. 230-241, 2016.

DE OLIVEIRA PEREIRA, Fellipe et al. The prevalence of dermatophytoses in Brazil: a systematic review. **Journal of Medical Microbiology**, Brasil, v. 70, 2021.

DE SOUZA, Patrícia Canteri et al. *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. **Journal of Microbiological Methods**, v. 118, p. 182–186, 2015.

DE SOUZA, Patrícia Canteri et al. An Invertebrate Host to Study Fungal Infections, Mycotoxins and Antifungal Drugs: *Tenebrio molitor*. **Journal of Fungi**, v. 4, p. 125-139, 2018.

DENG, Weiwei et al. Differential gene expression in HaCaT cells may account for the various clinical presentation caused by anthropophilic and geophilic dermatophytes infections. **Mycoses**, v. 12, p. 389-399, 2019.

DINH, Hue Dinh et al. Microbiology's next top model: Galleria in the molecular age. **Pathogens and Disease**, v. 79, 2021.

DOAN, Tan Nhut et al. Synthesis, Antioxidant and Antimicrobial Activities of a Novel Series of Chalcones, Pyrazolic Chalcones, and Allylic Chalcones. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 2, p. 282–8, 2011.

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

EBERT, Andreas et al. Alarming India-wide phenomenon of antifungal resistance in dermatophytes: A multicentre study. **Mycoses**, v. 63, p. 717-728, 2020.

ELEWSKI, Boni Elizabeth. Tinea capitis: a current perspective. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 4, p. 1-20, 2000.

ELKHALIFA, Dana et al. A comprehensive review on the antiviral activities of chalcones. **Journal of Drug Targeting**, v. 29, p. 403-419, 2021.

ESCALANTE, Andre et al. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1720-1725, 2008.

FIOCCO, Zeno et al. Disseminated tinea corporis under baricitinib therapy for atopic dermatitis. **Dermatologic Therapy**, v. 35, 2022.

FULLER, Claire et al. British Association of Dermatologists' guidelines for the management of tinea capitis 2014. **British Journal of Dermatology**, v.171, p. 454-463, 2014.

FUULER, Claire. Changing face of tinea capitis in Europe. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 22, p. 115-118, 2009.

GAURAV, Vishal et al. Terbinafine resistance in dermatophytes: Time to revisit alternate antifungal therapy. **Journal of Medical Mycology**, v. 31, 2020.

GHANNOUM, Mahmoud. Azole resistance in dermatophytes: prevalence and mechanism of action. **Journal of the American Podiatric Medical Association**, v. 106, p. 79-86, 2016

GHANNOUM, Mahmoud et al. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 501–17, 1999.

GIUNTI, Sebastián et al. Drug discovery: Insights from the invertebrate *Caenorhabditis elegans*. **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 9, 2021.

GNAT, Sebastian et al. Host- and pathogen-dependent susceptibility and predisposition to dermatophytosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, p. 823-836, 2019.

GRÄSER, Yvonne et al. New insights in dermatophyte research. **Medical Mycology**, v. 56, p. S2-S9, 2018.

GUAZELLI, Carla et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of hesperidin methyl chalcone in experimental ulcerative colitis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 333, 2021.

GUERRA, Felipe Queiroga Sarmiento et al. Evaluation of antifungal activity and mode of action of new coumarin derivative, 7-hydroxy-6-nitro-2H-benzopyran-2-one, against *Aspergillus spp.* **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1–8, 2015.

GUPTA, Aditya et al. Emerging drugs for the treatment of onychomycosis. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 24, p. 213-220, 2019a.

GUPTA, Aditya et al. Epidemiology and prevalence of onychomycosis in HIV-positive individuals. **International Journal of Dermatology**, v. 39, p.746–53, 2000.

GUPTA, Aditya et al. Global perspectives for the management of onychomycosis. **International Journal of Dermatology**, v. 58, p. 1118-1129, 2019b.

HASHEMIAN Seyed Mohammad et al. Caspofungin: a review of its characteristics, activity, and use in intensive care units. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 18, p. 1213-1220, 2020.

HAVLICKOVA, B.; CZAIIKA, V. A.; FRIEDRICH, M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. **The Authors Journal Compilation**, Berlin, Alemanha, p. 2–15, 2008.

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

HEIDRICH, D. **Dermatofitoses: Estudo de 16 anos na região metropolitana no sul do Brasil**. 2013. 64 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

HOOG, Sybren et al. Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 182, p. 5-31, 2017.

HOLMES, A. R et al. Targeting efflux pumps to overcome antifungal drug resistance. **Future Medicinal Chemistry**, v. 8, p.1485–501, 2016.

HSIEH, A. A new mutation in the SQLE gene of Trichophyton mentagrophytes associated to terbinafine resistance in a couple with disseminated tinea corporis. **Journal of Medical Mycology**, v. 29, p. 352-355, 2019.

HUANG, Meiling et al. The Role of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in the Inhibition of Trichophyton rubrum Growth by HaCaT Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2020, 2020.

HUANG, Zhe-Hao et al. Screening of chalcone analogs with anti-depressant, anti-inflammatory, analgesic, and COX-2-inhibiting effects. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 30, 2020.

ILLICACHI, Luis Alberto et al. Synthesis and DFT Calculations of Novel Vanillin-Chalcones and Their 3-Aryl-5-(4-(2-(dimethylamino)-ethoxy)-3-methoxyphenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazole-1-carbaldehyde Derivatives as Antifungal Agents. **Molecules**, v. 22, 2017.

JACOB, Tiago et al. Heat Shock Protein 90 (Hsp90) as a Molecular Target for the Development of Novel Drugs Against the Dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015.

JAIN, Swati et al. Current Trends of Dermatophytosis in Eastern Odisha. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 12, p. 10-14, 2020.

JASKIEWICZ, Maciej et al. Antimicrobial Activity of Selected Antimicrobial Peptides Against Planktonic Culture and Biofilm of *Acinetobacter baumannii*. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, p. 317–324, 2019.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1980. 561 p.

JORDÁ, Tania et al. Regulation of Ergosterol Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genes**, v. 11, 2020.

JOTHI, Ravi et al. Alteration of Cell Membrane Permeability by Cetyltrimethylammonium Chloride Induces Cell Death in Clinically Important *Candida* Species. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 20, 2022.

KHURANA, Ananta et al. Antifungal resistance in dermatophytes: recent trends and therapeutic implications. **Fungal Genetics and Biology**, v. 132, 2019.

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

KONG, Xue et al. Antifungal Susceptibility and Mutations in the Squalene Epoxidase Gene in Dermatophytes of the *Trichophyton mentagrophytes* Species Complex. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 65, 2021.

KÖHLER, Julia et al. Fungi that Infect Humans. **Microbiology Spectrum**, v. 5, 2017.

KUMAR, Nishanth et al. Activity and synergistic interactions of stilbenes and antibiotic combinations against bacteria in vitro. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 3143-3150, 2012.

LEWIS, James 2<sup>nd</sup> et al. Fungicidal versus Fungistatic: what's in a word? **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 9, p. 927-935, 2008.

LIN, Belinda Bin et al. Multiplex RT-PCR provides improved diagnosis of skin and nail dermatophyte infections compared to microscopy and culture: a laboratory study and review of the literature. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 101, 2021.

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

LOZOYA-PÉREZ, Nancy et al. *Tenebrio molitor* as an Alternative Model to Analyze the *Sporothrix* Species Virulence. **Infection and Drug Resistance**, v. 2021, p. 2059-2072, 2021.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**. 14. ed., Porto Alegre: Artmed, 2016.

MAHAPATRA, Debarshi et al. Chalcones and their therapeutic targets for the management of diabetes: structural and pharmacological perspectives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.92, p. 839-865, 2015.

MALLICK, Sanjay et al. Current mycological profile of dermatophytosis in a tertiary care set up in North Bengal. **Journal of Pakistan Association of Dermatologists**, vol. 25, p. 35-39, 2016.

MALTA, Deborah Carvalho et al. Prevalência de diabetes mellitus determinada pela hemoglobina glicada na população adulta brasileira, Pesquisa Nacional de Saúde. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, Rio de Janeiro, v. 22, 2019.

MANI-LÓPEZ, Emma et al. A review of the methods used to determine the target site or the mechanism of action of essential oils and their components against fungi. **SN Applied Sciences**, vol. 44, 2021.

MARKANTONATOU, Anthi-Marina et al. Dermatophytic Biofilms: Characteristics, Significance and Treatment Approaches. **Journal of Fungi**, vol. 9, p. 228, 2023.

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

MARTINEZ, Roberto. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 449-460, 2006.

MARTINEZ-ROSSI, Nilce et al. Pathogenesis of Dermatophytosis: Sensing the Host Tissue. **Mycopathologia**, vol. 182, p. 215-227, 2017.

MARTINEZ-ROSSI, Nilce et al. State-of-the-Art Dermatophyte Infections: Epidemiology Aspects, Pathophysiology, and Resistance Mechanisms. **Journal of Fungi**, vol. 7, p. 629, 2021.

MEYER, Brian et al. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-4, 1982.

MEZZARI, Adelina et al. Prevalência de Micoses Superficiais e Cutâneas em Pacientes Atendidos Numa Atividade de Extensão Universitária. **Revista Brasileira da Ciência da Saúde**, v. 21, p. 151-156, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Dermatologia na Atenção Básica de Saúde. **CADERNOS DE ATENÇÃO BÁSICA**. Brasília: Ed. **Ministério da Saúde**, 2002.

MIRZAEI, Hassan et al. Indole-derived chalcones as anti-dermatophyte agents: In vitro evaluation and in silico study. **Computational Biology and Chemistry**, vol. 84, 2020.

MOREIRA, Carlos Jorge da Silva. **Deciphering novel targets for antifungal drugs: ionic liquids as triggers of alternative pathways for cell wall integrity in filamentous fungi**. 2015. Dissertação (Tese de mestrado em Microbiologia Aplicada) - Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Lisboa, 2015.

MOSKALUK, Alex et al. Current Topics in Dermatophyte Classification and Clinical Diagnosis. **Pathogens**, vol. 11, p. 957, 2022

MUKHERJEE, Pranab et al. Clinical *Trichophyton rubrum* strain exhibiting primary resistance to terbinafine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 47, p. 82-86, 2003.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

NASCENTES, Julyanna Andrade Silva. **Síntese e avaliação de metoxichalconas como agentes antidermatofíticos**. Orientador: Prof. Dr. Luis Octavio Regasini. 2022. 135 p. Dissertação (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, [S. l.], 2022.

NASR, Abir et al. Epidemiology of superficial mycoses in Northern Greece: a 4-year study. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, vol. 30, p. 837-9, 2015.

NENOFF, Pietro et al. Mycology - an update. Part 1: Dermatmycoses: causative agents, epidemiology and pathogenesis. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, vol. 12, p. 188-209, 2014a.

NENOFF, Pietro et al. Mycology - an update Part 2: Dermatmycoses: clinical picture and diagnostics. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, vol. 12, p. 749-77, 2014b.

NENOFF, Pietro et al. Mycology - an update Part 3: Dermatmycoses: topical and systemic therapy. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, vol. 13, p. 387-410, 2015.

NEVES, Juan et al. The presence of dermatophytes in infected pets and their household environment. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 06, p. 1747-1753, 2018.

O'BRIEN, Jonh et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 5421-26, 2000.

OKOLO, Emelda et al. New chalcone derivatives as potential antimicrobial and antioxidant agent. **Scientific Reports**, 2021 vol. 11, p. 21781, 2021.

OLIVEIRA, Josenildo Rodrigues et al. Pitiríase Versicolor. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 77, p. 611-618, 2002.

OSBORNE, Colin et al. Amino Acid Substitution in *Trichophyton rubrum* Squalene Epoxidase Associated with Resistance to Terbinafine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 19, p. 2840-2844, 2005.

OUYANG, Yang et al. Chalcone Derivatives: Role in Anticancer Therapy. **Biomolecules**, vol. 11, p. 894, 2021.

PANDA, Atulya et al. Niacin esters of chalcones with tumor-selective properties. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, vol. 31, p. 1451-1456, 2016.

PAVAN, Fernando et al. Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: Anti – Mycobacterium tuberculosis activity and cytotoxicity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 45, p. 1898-1905, 2010.

PIPPI, Bruna et al. New insights into the mechanism of antifungal action of 8-hydroxyquinolines. **Saudi Pharmaceutical Journal**, vol. 27, p. 41-48, 2019.

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

POOJARY, Shital et al. Topical antifungals: a review and their role in current management of dermatophytoses. **Clinical Dermatology Review**, vol. p. 24–29, 2017.

QIN, Hua-li et al. Chalcone hybrids as privileged scaffolds in antimalarial drug discovery: A key review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 193, p. 112215, 2020.

RADHA, Hasoon et al. Improvement of the Selectivity Index (SI) and Cytotoxicity Activity of Doxorubicin Drug by *Panax ginseng* Plant Extract. **Archives of Razi Institute**, vol. 76, p. 659-666, 2021.

RAJAGOPALAN, Murlidhar et al. Expert Consensus on The Management of Dermatophytosis in India (ECTODERM India). **BMC Dermatology**, vol. 18, p. 6, 2018.

REVIE, Nicole et al. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. **Current Opinion in Microbiology**, vol. 45, p. 70-76, 2018.

SACHELI, Rosalie et al. Antifungal Resistance in Dermatophytes: Genetic Considerations, Clinical Presentations and Alternative Therapies. **Journal of Fungi**, vol. 7, p. 983, 2021.

SAHNI, Kanika et al. Newer topical treatments in skin and nail dermatophyte infections. **Indian Dermatology Online Journal**, vol. 9, p. 149–158, 2018.

SAHOO, Alok et al. Management of tinea corporis, tinea cruris, and tinea pedis: A comprehensive review. **Indian Dermatology Online Journal**, vol. 7, p. 77-86, 2016.

SARDANA, Kabir et al. Immunopathogenesis of Dermatophytoses and Factors Leading to Recalcitrant Infections. **Indian Dermatology Online Journal**, vol. 12, p. 389-399, 2021.

SHAMSIKHADE, Forough et al. In vitro activities of 8 antifungal agents against geophilic dermatophyte isolates. **Mycoses**, vol. 65, p. 255-262, 2022.

SIDRIM, José Julio Costa et al. *Trichophyton tonsurans* strains from Brazil: phenotypic heterogeneity, genetic homology, and detection of virulence genes. **Canadian Journal of Microbiology**, vol. 59, p. 754-60, 2013.

- SILVA, Larissa et al. Identification and antifungal susceptibility of fungi isolated from dermatomycoses. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 28, p. 633–40, 2013.
- SILVA, Lauriene et al. Atividade fungicida de plantas do cerrado contra micoses superficiais e cutâneas. **Revista Saúde e Meio Ambiente – Resma**, v. 6, p. 1-16, 2018.
- SITTART, José Alexandre et al. Prevalência das dermatoses em pacientes da 4ª idade. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 6, p. 125-129, 2008.
- SIVAKUMAR, Ponnurengam et al. Antifungal Activity, Mechanism and QSAR Studies on Chalcones. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 74, p. 68–79, 2009.
- SOARES, Luciana Arantes et al. Anti-trichophyton activity of protocatechuates and their synergism with fluconazole. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 2014, 2014.
- SOOKNUAI Pichjira et al. Synthesis and neuroprotective effects of novel chalcone-triazole hybrids. **Bioorganic Chemistry**, vol. 105, 2020.
- SOUZA, Eliane et al. Frequência de onicomicoses por leveduras em Maringá, Paraná, Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, p.151-156, 2007.
- STONE, Neil et al. Liposomal Amphotericin B (AmBisome®): A Review of the Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Clinical Experience and Future Directions. **Drugs**, vol. 76, p. 485-500, 2016.
- TRIFAN, Adriana et al. Honokiol and Magnolol: Insights into Their Antidermatophytic Effects. **Plants**, vol. 10, 2021.
- VENTURA, Thatiana et al. Antimycobacterial and anti-inflammatory activities of substituted chalcones focusing on an anti-tuberculosis dual treatment approach. **Molecules**, v. 20, p. 8072-8093, 2015.
- VERMA, Shyam et al. The unprecedented epidemic-like scenario of dermatophytosis in India: I. Epidemiology, risk factors and clinical features. **Indian Journal of Dermatology Venereology and Leprology**, vol. 87, p. 154-175, 2021.
- WANG, Fu-Cheng et al. Synthesis and cytotoxic activity of chalcone analogues containing a thieno[2,3-d]pyrimidin-2-yl group as the A-ring or B-ring. **Bioorganic Chemistry**, vol. 94, 2020.
- WANG, Ruojun et al. Invasive dermatophyte infection: A systematic review. **Mycoses**, vol. 64, p. 340-348, 2021.
- WEITZMAN, Irene et al. The dermatophytes. **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 8, p. 240-259, 1995.
- WHITE, Theodore et al. Fungi on the skin: dermatophytes and *Malassezia*. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, vol. 4, 2014.

WIEDERHOLD, Nathan et al. Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. **Infection and Drug Resistance**, vol. 10, p. 249-259, 2017.

WU, Jun et al. A chalcone derivative reactivates latent HIV-1 transcription through activating P-TEFb and promoting Tat-SEC interaction on viral promoter. **Scientific Reports**, vol. 7, 2017.

XU, Man et al. Chalcone derivatives and their antibacterial activities: Current development. **Bioorganic Chemistry**, vol. 91, 2019.

YADAV, Neesha et al. Antimalarial Activity of Newly Synthesized Chalcone Derivatives In Vitro. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 80, p. 340-347, 2012.

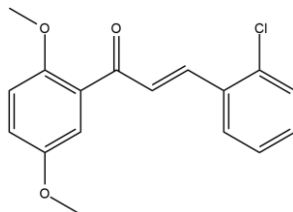
ZAHARA, Kulsoom et al. Isolation and Identification of Bioactive Compounds from *Bidens* spp. Using HPLC-DAD and GC-MS Analysis and Their Biological Activity as Anticancer Molecules. **Molecules**, vol. 27, p. 1927, 2022.

ZAITZ, Clarisse et al. **Compêndio de micologia médica**. 2<sup>a</sup>. ed. [S. l.]: Guanabara Koogan, 2010. 456 p.

ZHUANG, Chunlin et al. Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 117, p. 7762-7810, 2017.

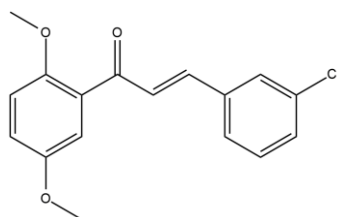
## APÊNDICE A: ANÁLISES DE RESSÔNANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

### Chalcona 2Cl



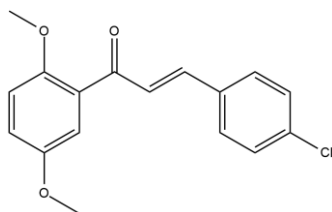
Pó amarelo; PF: 113°C. **RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz):**  $\delta$  7.91 (d,  $J = 15.9$  Hz, 3H), 7.58 (dd,  $J = 7.1, 2.3$  Hz, 5H), 7.31 – 7.27 (m, 6H), 7.21 – 7.17 (m, 5H), 7.16 (dd,  $J = 9.6, 8.1$  Hz, 5H), 7.09 (d,  $J = 3.2$  Hz, 4H), 6.92 (dd,  $J = 9.0, 3.2$  Hz, 5H), 6.82 (d,  $J = 9.0$  Hz, 5H), 3.74 (s, 17H), 3.69 (d,  $J = 5.8$  Hz, 17H).

### Chalcona 3Cl

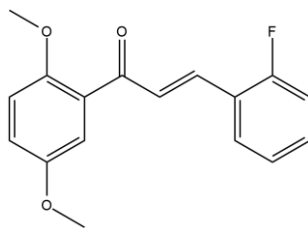


Pó amarelo, PF: 110°C. **RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz):**  $\delta$  7.91 (d,  $J = 15.9$  Hz, 1H), 7.58 (dd,  $J = 7.1, 2.3$  Hz, 1H), 7.31 – 7.28 (m, 1H), 7.20 – 7.17 (m, 1H), 7.15 (dd,  $J = 11.3, 4.1$  Hz, 1H), 7.09 (d,  $J = 3.2$  Hz, 1H), 6.92 (dd,  $J = 9.0, 3.2$  Hz, 1H), 6.82 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.69 (d,  $J = 5.8$  Hz, 3H).

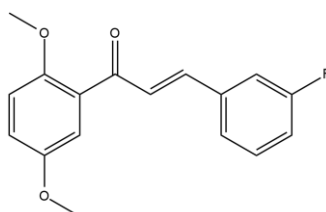
### Chalcona 4Cl



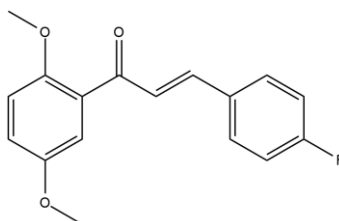
Pó amarelo; PF: 115°C. **RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz):**  $\delta$  7.66 (d,  $J = 15.9$  Hz, 6H), 7.59 (s, 8H), 7.56 (d,  $J = 13.6$  Hz, 6H), 7.46 (d,  $J = 15.9$  Hz, 7H), 7.43 (d,  $J = 8.2$  Hz, 9H), 7.34 – 7.26 (m, 4H), 7.09 (t,  $J = 12.5$  Hz, 6H), 7.01 (d,  $J = 9.0$  Hz, 6H), 3.93 (s, 21H), 3.89 (d,  $J = 15.3$  Hz, 21H).

**Chalcona 2F**

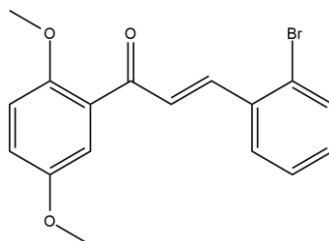
Pó amarelo; PF: 85°C. **RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz):**

**Chalcona 3F**

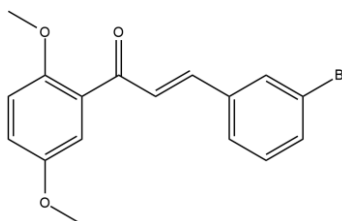
Pó amarelo; PF: 90°C. **RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz):**  $\delta$  7.82 (s, 1H), 7.75 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 7.65 (d,  $J = 15.9$  Hz, 1H), 7.63 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.53 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.49 (d,  $J = 15.9$  Hz, 1H), 7.21 (dd,  $J = 10.6, 3.2$  Hz, 1H), 7.05 (dd,  $J = 9.0, 3.2$  Hz, 1H), 6.95 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 3.87 (d,  $J = 3.7$  Hz, 3H), 3.81 (d,  $J = 4.0$  Hz, 3H).

**Chalcona 4F**

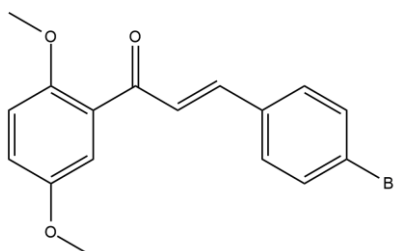
Pó amarelo; PF: 90°C. **RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz):**  $\delta$  7.82 (s, 5H), 7.75 (d,  $J = 7.8$  Hz, 5H), 7.65 (d,  $J = 15.9$  Hz, 6H), 7.62 (d,  $J = 8.1$  Hz, 4H), 7.53 (d,  $J = 7.8$  Hz, 5H), 7.48 (s, 4H), 7.21 (dd,  $J = 10.8, 3.2$  Hz, 5H), 7.05 (dd,  $J = 9.0, 3.2$  Hz, 4H), 6.95 (d,  $J = 9.0$  Hz, 5H), 3.87 (d,  $J = 4.0$  Hz, 16H), 3.81 (d,  $J = 4.2$  Hz, 18H).

**Chalcona 2Br**

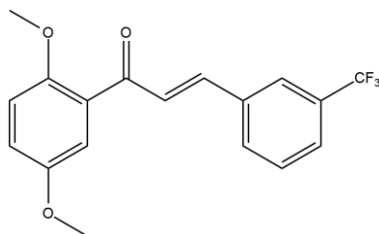
Pó amarelo; PF: 92°C. **RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz):**  $\delta$  7.98 (d,  $J = 15.8$  Hz, 1H), 7.69 (dd,  $J = 7.8, 1.3$  Hz, 1H), 7.61 (dd,  $J = 8.0, 0.8$  Hz, 1H), 7.35 (d,  $J = 6.1$  Hz, 1H), 7.33 (t,  $J = 3.7$  Hz, 1H), 7.23 (dd,  $J = 7.8, 1.4$  Hz, 1H), 7.21 (d,  $J = 3.2$  Hz, 1H), 7.04 (dd,  $J = 9.0, 3.2$  Hz, 1H), 6.94 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 3.86 (s, 4H), 3.84 – 3.78 (m, 4H).

**Chalcona 3Br**

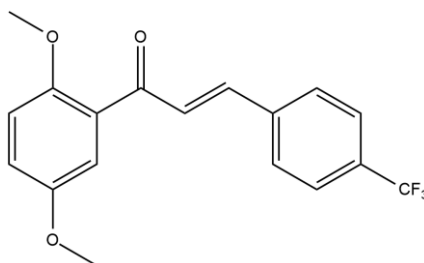
Pó amarelo; PF: 95°C. **RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz):**  $\delta$  7.57 (d,  $J = 15.9$  Hz, 9H), 7.52 (d,  $J = 1.7$  Hz, 7H), 7.51 (s, 10H), 7.45 (d,  $J = 1.7$  Hz, 12H), 7.44 – 7.42 (m, 13H), 7.40 (d,  $J = 3.0$  Hz, 6H), 7.19 (d,  $J = 3.2$  Hz, 8H), 7.03 (dd,  $J = 9.0, 3.2$  Hz, 9H), 6.94 (d,  $J = 9.0$  Hz, 10H), 3.86 (d,  $J = 5.8$  Hz, 33H), 3.81 – 3.78 (m, 34H).

**Chalcona 4Br**

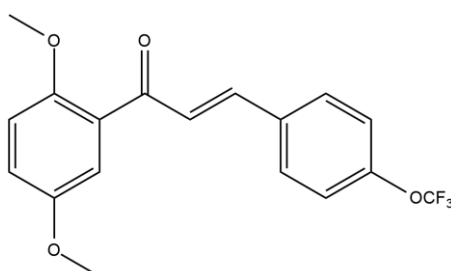
Pó amarelo; PF: 90°C. **RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz):**  $\delta$  7.57 (d,  $J = 15.9$  Hz, 2H), 7.53 (d,  $J = 1.6$  Hz, 2H), 7.51 (d,  $J = 1.8$  Hz, 2H), 7.45 (d,  $J = 2.1$  Hz, 3H), 7.44 – 7.42 (m, 3H), 7.40 (d,  $J = 2.8$  Hz, 2H), 7.19 (d,  $J = 3.2$  Hz, 2H), 7.04 (dd,  $J = 9.0, 3.2$  Hz, 2H), 6.94 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 3.86 (s, 8H), 3.81 (s, 7H).

**Chalcona 3CF3**

Pó amarelo; PF: 130°C. **RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz):**  $\delta$  7.82 (s, 1H), 7.76 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.63 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 7.53 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.22 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H), 7.06 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 6.95 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.82 (s, 4H).

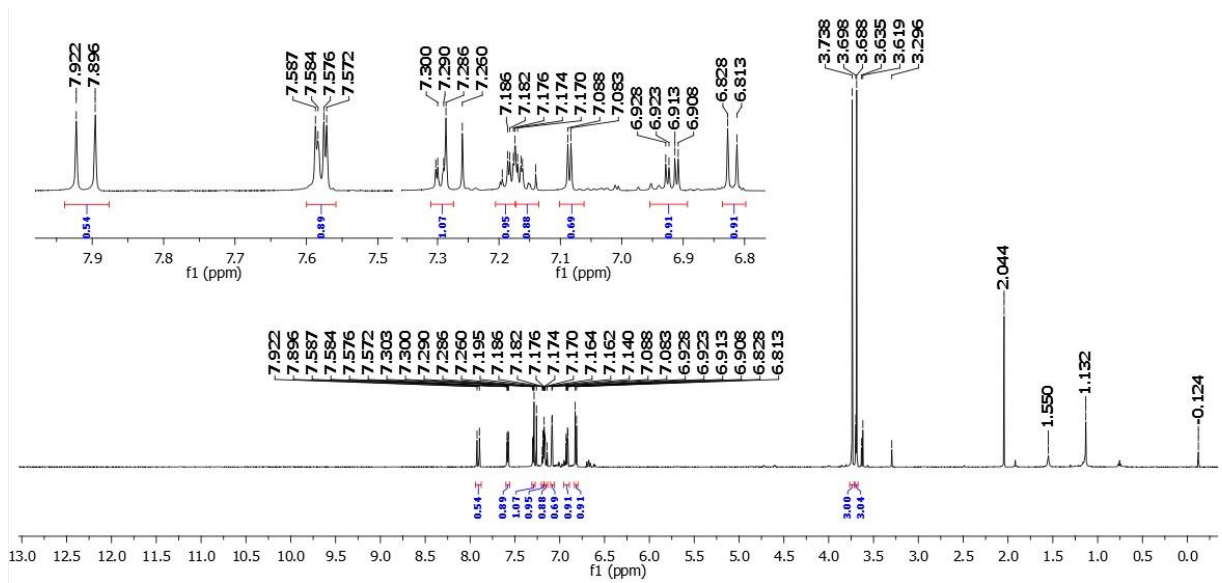
**Chalcona 4CF3**

Pó amarelo; PF: 140°C. **RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz):**  $\delta$  7.57 (d,  $J = 15.9$  Hz, 2H), 7.53 (d,  $J = 1.7$  Hz, 2H), 7.51 (s, 2H), 7.45 (s, 3H), 7.43 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H), 7.40 (s, 1H), 7.19 (d,  $J = 3.2$  Hz, 2H), 7.04 (dd,  $J = 9.0, 3.2$  Hz, 2H), 6.94 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 3.87 (d,  $J = 6.2$  Hz, 7H), 3.80 (d,  $J = 10.3$  Hz, 7H).

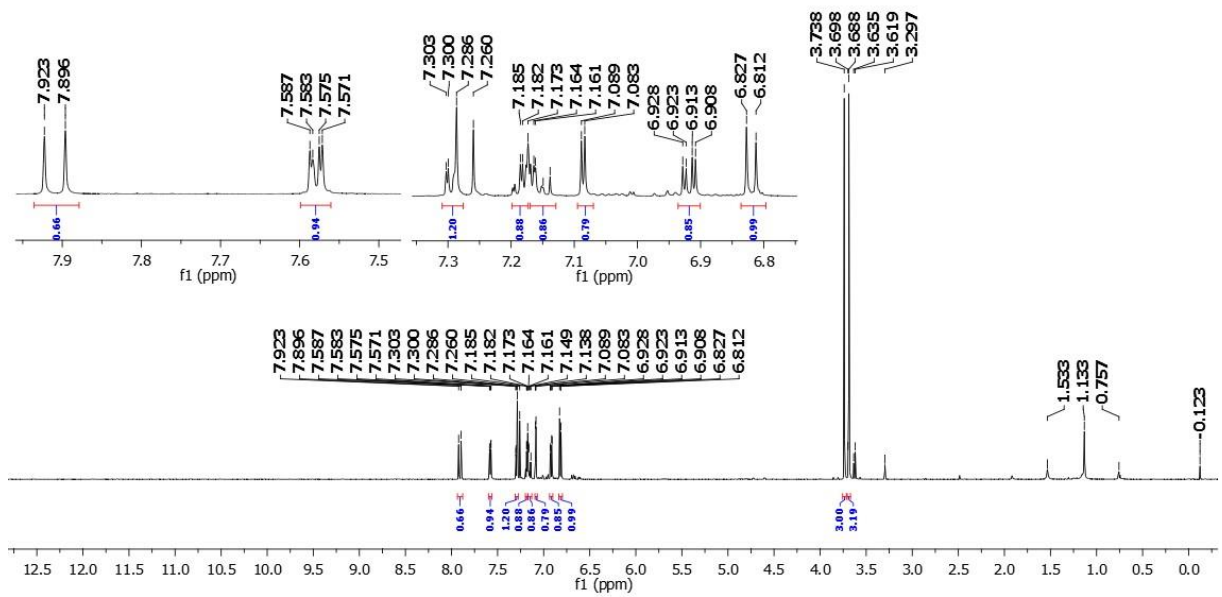
**Chalcona 4OCF3**

Pó amarelo; PF: 135°C. **RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz):**  $\delta$  7.59 (d,  $J = 15.9$  Hz, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.40 (d,  $J = 15.9$  Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.19 (d,  $J = 3.2$  Hz, 1H), 7.03 (dd,  $J = 9.0, 3.2$  Hz, 1H), 6.94 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.80 (s, 3H).

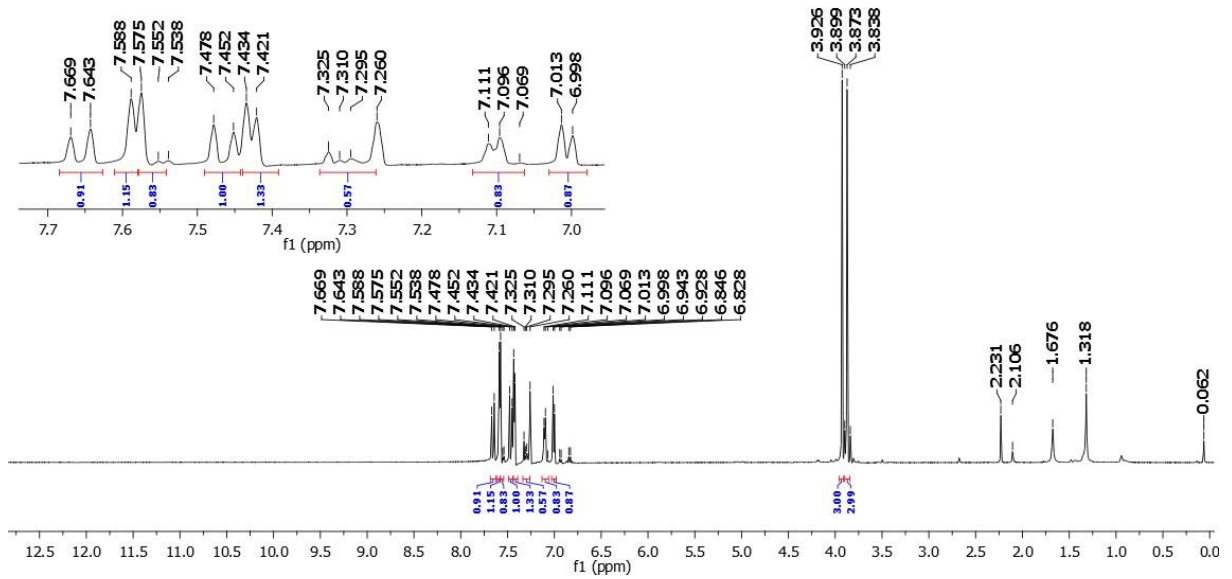
**Figura 26.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da chalcona **2Cl** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**Figura 27.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da chalcona **3Cl** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**Figura 28.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da chalcona **4Cl** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**Figura 29.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da chalcona **3F** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

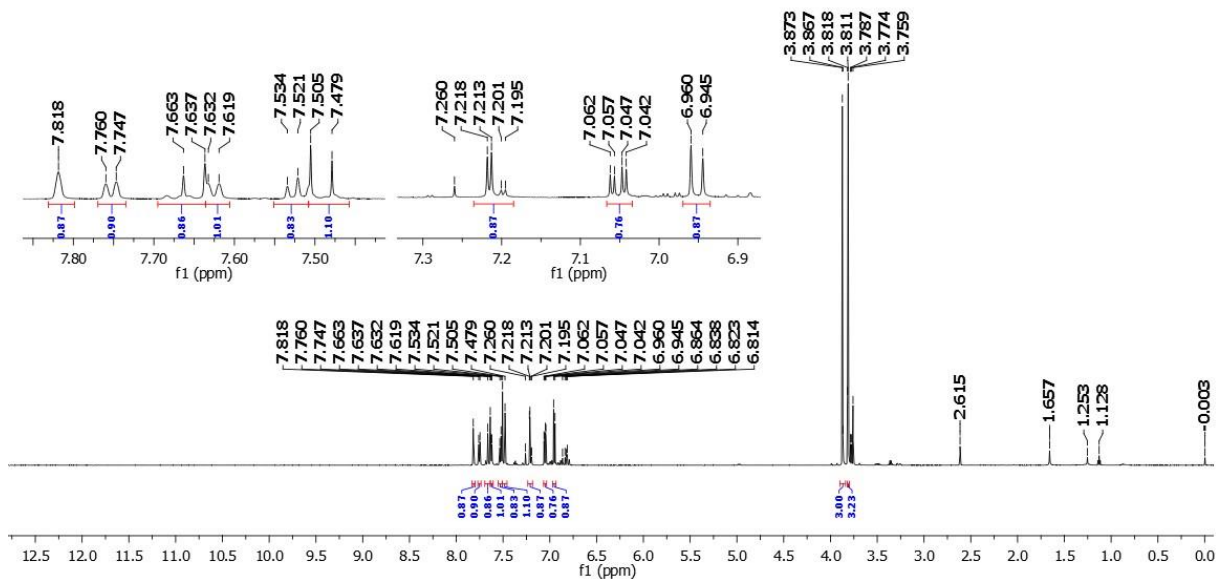


Figura 30. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da chalcona **4F** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

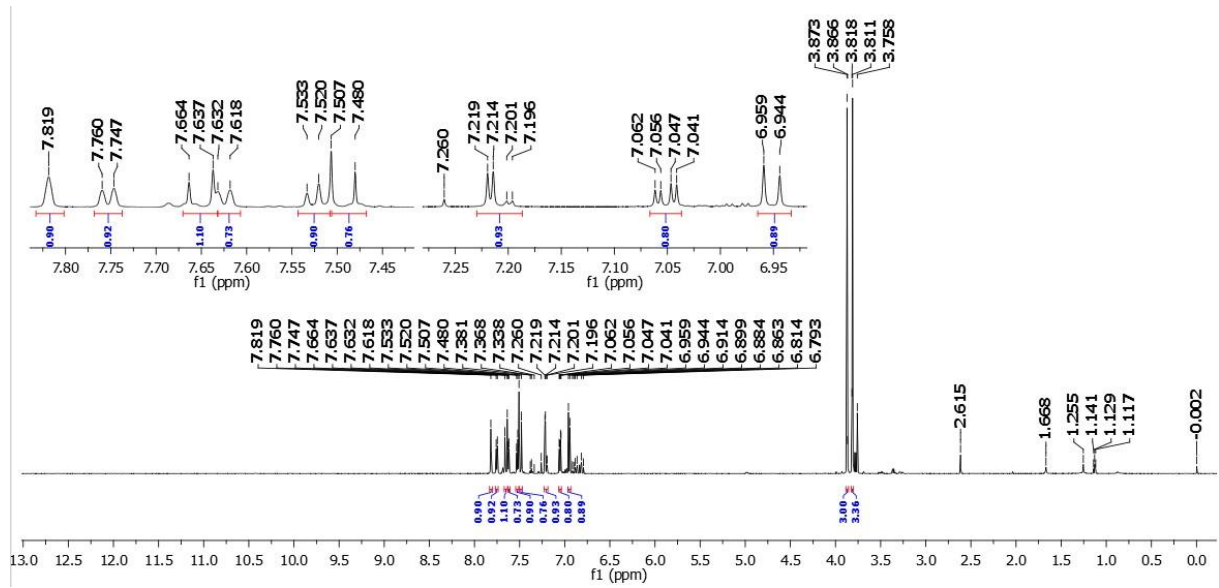
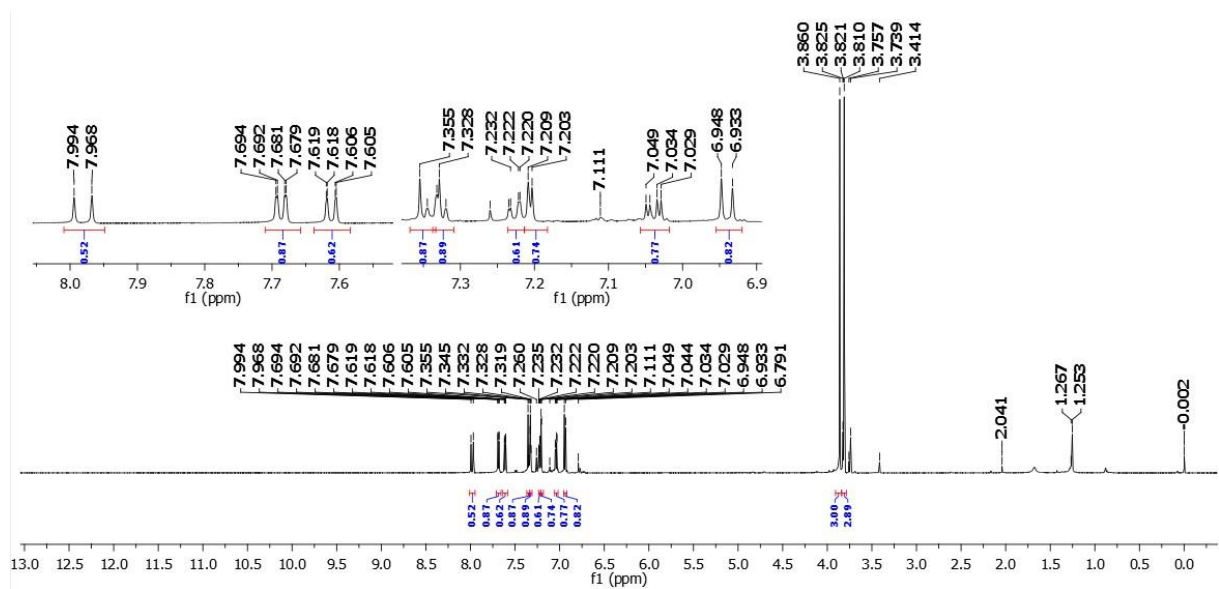
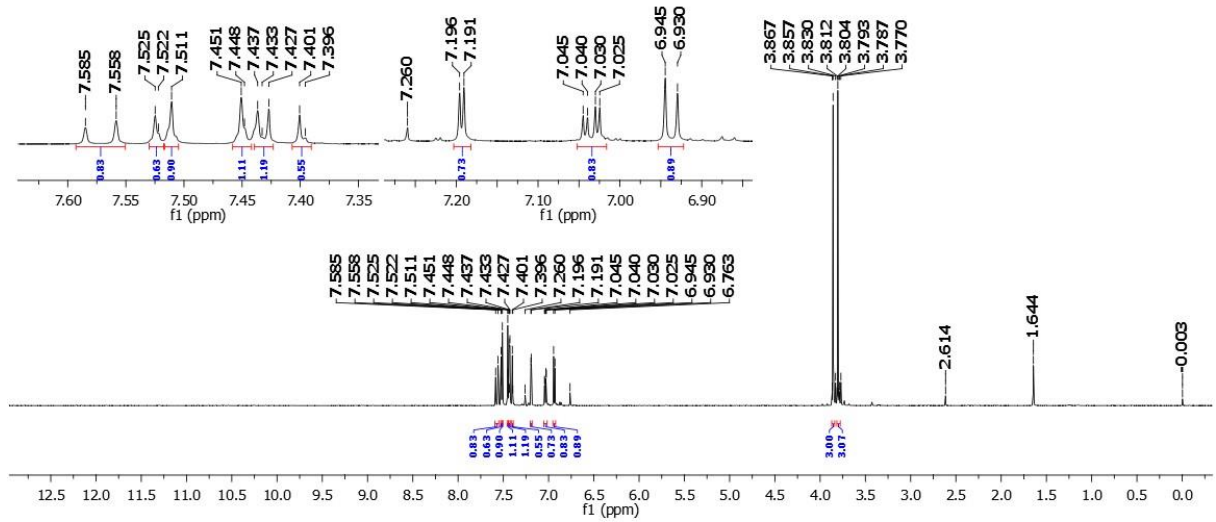


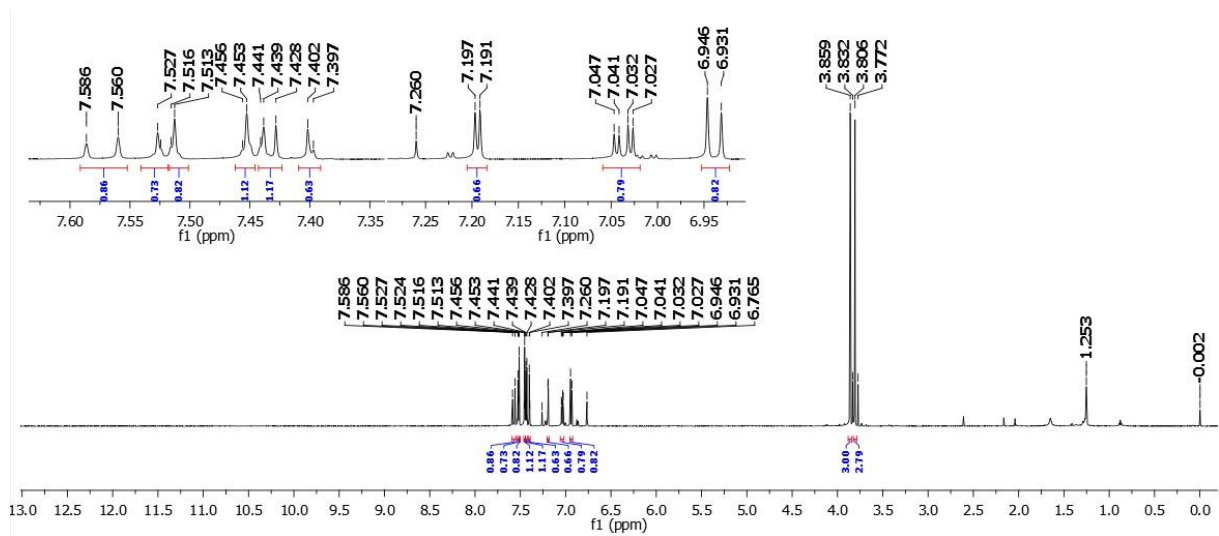
Figura 31. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da chalcona **2Br** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



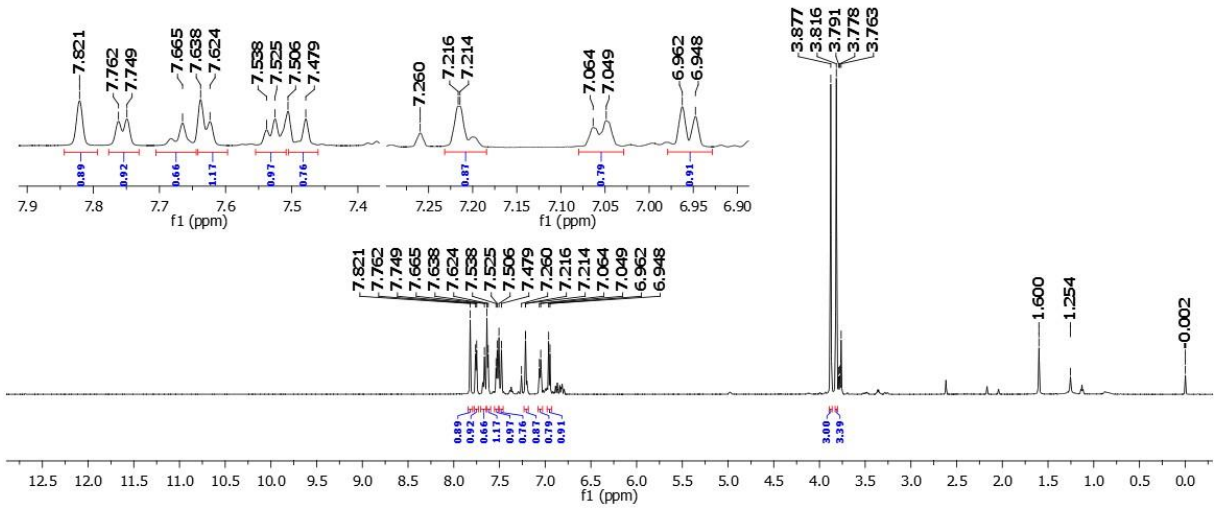
**Figura 32.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da chalcona **3Br** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**Figura 33.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da chalcona **4Br** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**Figura 34.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da chalcona **3CF3** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**Figura 35.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da chalcona **4CF4** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

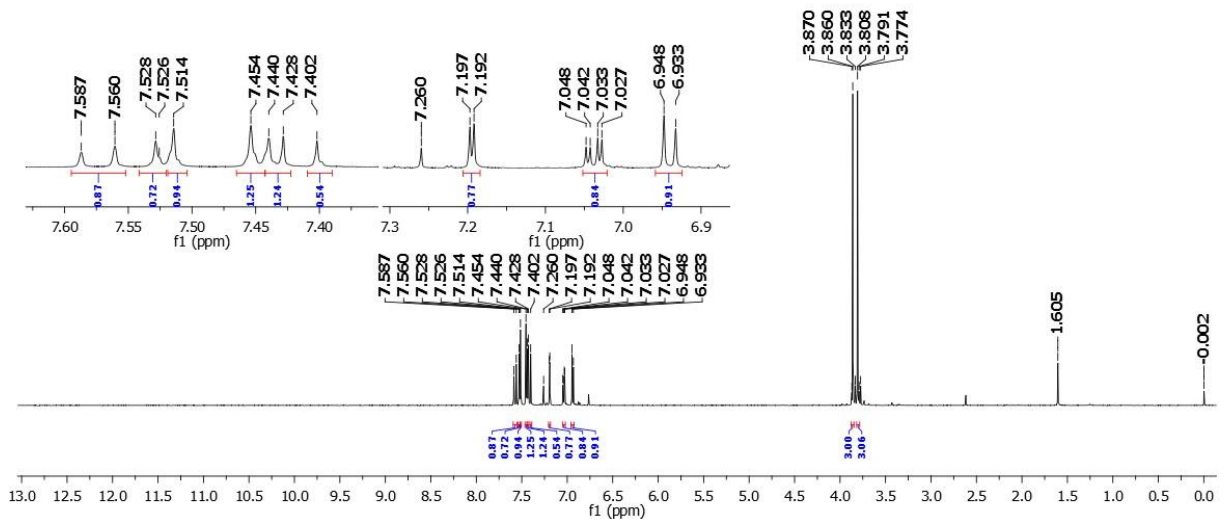


Figura 36. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da chalcona **4OCF3** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

