

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA
APLICADAS À FARMÁCIA

LUANA ROSSI OLIVEIRA MIDORICAVA

**PROSPECÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTI *Histoplasma capsulatum* NAS
FORMAS PLANCTÔNICA E BIOFILME E ANÁLISE PROTEÔMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, como um dos pré-requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida

Araraquara

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA
APLICADAS À FARMÁCIA



LUANA ROSSI OLIVEIRA MIDORICAVA

**PROSPECÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTI *Histoplasma capsulatum* NAS
FORMAS PLANCTÔNICA E BIOFILME E ANÁLISE PROTEÔMICA**

Araraquara

2015

Ficha Catalográfica

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

O48p Oliveira, Luana Rossi
 Prospecção de substâncias anti *Histoplasma capsulatum* nas formas planctônica e biofilme e análise proteômica / Luana Rossi Oliveira. – Araraquara, 2015
 122 f.

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

 1. Histoplasma capsulatum. 2. Biofilme. 3. Proteômica. I. Almeida, Ana Marisa Fusco, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

LUANA ROSSI OLIVEIRA MIDORICAVA

**PROSPECÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTI *Histoplasma capsulatum* NAS
FORMAS PLANCTÔNICA E BIOFILME E ANÁLISE PROTEÔMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, como um dos pré-requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

APROVADA EM / /

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – FCF Araraquara

Prof. Dra. Maria Aparecida de Resende Stoianoff

Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

Prof. Dra. Juliana Campos Junqueira

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – São José dos Campos

Aos meus pais, Sebastião e Maria Elizabeth e minha filha Vitória.

AGRADECIMENTOS

A Deus a minha gratidão pela batalha e proteção, poi sei que o Senhor só dá grandes batalhas aos melhores guerreiros;

À minha família pelo apoio e amor incondicional, incentivo e suporte, em especial aos meus pais, meu “ursinho Pooh” preto e minha “princesa”.

À luz do meu viver, minha filha Vitória, por quem todos os dias tento ser uma pessoa melhor.

Às minhas irmãs de coração, Raíza, Maíra e Flávia: com elas fiz as maiores loucuras, paguei os maiores micos, e tive os melhores momentos da minha vida! Obrigada por serem minhas.

À família Midoricava, por todo o suporte, incentivo e apoio.

À Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida pela orientação, disponibilidade, incentivo, pela oportunidade de crescimento profissional e, sobretudo, por acreditar em mim.

À Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini o meu agradecimento pelo exemplo de ética e a minha admiração pela profissional que é.

Às duas “Rôs”, Rosângela Moraes da Silva por todo o apoio e ensinamento em todos os sentidos e à Rosemira pelos quitutes deliciosos.

Aos amigos do Laboratório de Micologia: “tivemos planos, tivemos sonhos e muitos foram frustrados. Fizemos planos e muitos foram desfeitos. Vivemos ilusões que se perderam, decepções e desuniões, mas vivemos também bons momentos, compartilhamos a mesma jornada, aprendemos a lutar, sobreviver, crescer, a crer na superação dos erros e a acreditar nos valores humanos. E hoje , os nossos corações se

preparam para viver a busca de cada ideal sonhado, e, principalmente, a realização do que mais se esperou: o fim de uma história que mal começou”. A vocês, Cláudia Tavares, Paulo Cesar Gomes, Ana Cerrejón, Kayla Medina, Liliana Scorzoni, Haroldo Oliveira, Suélen Rossi, Jaqueline Derissi, Ana Carolina Silva, Junya de Lacorte, Caroline Orlandi, Regina Pires, Caroline Marcos, Patrícia Akemi, Mônica Yonashiro, Fernanda Gullo, Wanessa Melo, Nayla Pitangui, Natália Strohmayr, Rodrigo Almeida, Fernanda Sangalli, Julhiany Silva, Janaina Sardi, Maysa Rosinha, Rosângela Moraes, Fernanda Campos, Priscila Lacerda e Conceição, o meu muito obrigada!

Agradeço, em especial às “feinhas” mais lindas do meu coração: Junya de Lacorte e Caroline Orlandi. Não tenho palavras para agradecer por toda ajuda em todos os momentos difíceis, sejam eles pessoais ou profissionais e também pelos bons e inesquecíveis momentos que vivemos juntas, tudo foi mais fácil com vocês ao meu lado.

E por último, mas não menos importante, agradeço à Liliane Scorzoni por toda a ajuda e dedicação na padronização da análise proteômica, conselhos e amizade e aos “tormentos” Mônica Yonashiro e Wanessa Melo pelos momentos inesquecíveis.

*“Pra começar...
Cada coisa em seu lugar
E nada como um dia após o outro*

*Por que apressar?
Se nem sabe onde chegar
Correr em vão se o caminho é longo*

*Quem se soltar, da vida vai gostar
E a vida vai gostar de volta em dobro*

*E se tropeçar
Do chão não vai passar
Quem sete vezes cai, levanta oito*

*Quem julga saber
E esquece de aprender
Coitado de quem se interessa pouco*

*E quando chorar
Tristeza pra lavar
Num ombro cai metade do sufoco*

*O novo virá
Pra re-harmonizar
A terra, o ar, água e o fogo*

*E sem se queixar
As peças vão voltar
Pra mesma caixa no final do jogo*

*Pode esperar
O tempo nos dirá
Que nada como um dia após o outro*

*O tempo dirá
O tempo é que dirá
E nada como um dia apos o outro”.*

Tiago Iorc

RESUMO

Histoplasma capsulatum variedade *capsulatum* é um fungo dimórfico causador da Histoplasmose, uma doença fúngica sistêmica que constitui um importante problema de saúde mundial. A infecção ocorre através da inalação de propágulos infectantes provenientes do meio ambiente. A capacidade de formação de biofilme por esse fungo foi caracterizada recentemente, porém ainda pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na sua formação. Neste caso, estudos com abordagens proteômicas seriam de fundamental importância para o entendimento da diferença entre a forma planctônica e o biofilme. Os antifúngicos usados na terapia convencional contra biofilmes não são eficientes, além disso, doses elevadas para perfusão destes fármacos nesta forma seriam tóxicas para os pacientes. O presente trabalho teve como objetivo verificar a atividade anti-*Histoplasma* de 92 compostos derivados de chalcona e do ácido protocatecuico; caracterizar o biofilme do isolado clínico *H. capsulatum* 317 e pesquisar compostos anti-biofilme buscando um provável mecanismo de ação através da análise proteômica diferencial entre o biofilme tratado e não tratado. Os testes de susceptibilidade foram realizados conforme o documento M27-A3, proposto pelo CLSI (2008). Os biofilmes foram formados em caldo BHI suplementado e a atividade metabólica foi determinada através do ensaio de redução do XTT. Para a caracterização da formação do biofilme e da ação do composto, utilizou-se a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal, enquanto que a massa do biofilme e a matriz extracelular foram quantificadas pelo cristal violeta e safranina. E como etapa final foi realizada a análise do perfil proteico dos biofilmes com e sem tratamento. Os melhores valores de concentração inibitória mínima (CIM) foram obtidos por seis derivados de chalconas (T50, C3, E2A, F2A, T18A e T46A) e pelo protocatecuato de nonila (CIM = 3,9 mg/L). O isolado clínico *H. capsulatum* EH317 foi capaz de formar biofilme *in vitro* após 96 horas, em caldo BHI suplementado. Após 96 horas, o biofilme formado atingiu um valor máximo de atividade metabólica e produziu mais biomassa e matriz extracelular, quando comparado aos demais tempos. A microscopia confocal revelou uma espessura média dos biofilmes maduros de 22 µm. O protocatecuato de nonila foi capaz de inibir a formação do biofilme nas concentrações iguais ou superiores a 3,9 mg/L, enquanto que, no biofilme maduro, o mesmo composto causou redução de 90% da atividade metabólica

nas concentrações iguais ou superiores a 125 mg/L. A microscopia confocal e as quantificações por cristal violeta e safranina dos biofilmes tratados revelaram a redução da espessura, biomassa e material polissacarídico. A análise do perfil proteico mostrou a expressão de proteínas de massas moleculares diferentes no biofilme não tratado, quando comparado ao tratado. Esses resultados contribuem para a pesquisa de novas drogas antifúngicas e anti-biofilme e eleva o protocatecuato de nonila a composto promissor.

ABSTRACT

Histoplasma capsulatum var. *capsulatum* is a dimorphic fungi that causes Histoplasmosis, a systemical fungal disease that is a major health problem worldwide. Infection occurs by inhalation of infective propagules from the environment. The biofilm formation by this fungi was characterized recently, however little is known about the mechanisms involved in their formation. In this case, studies with proteomic approaches would be of fundamental importance for understanding the difference between the planktonic and biofilm forms. The antifungal agents used in conventional therapy are not effective against biofilms, in addition, high doses of these drugs can be toxic to patients. This study aimed to verify the anti-*Histoplasma* activity of 93 compounds derived from chalcones and protocatechuic acid; characterize the biofilm formation by the clinical isolate *H. capsulatum* 317 and discover new anti-biofilm compounds searching for a mechanism of action by differential proteomics analysis, comparing the treated and untreated biofilms. Susceptibility tests were performed according to the document M27-A3, proposed by the CLSI (2008). The biofilms were formed in BHI broth supplemented and metabolic activity was determined by the XTT reduction assay. For the characterization of biofilm formation and action of the compound, was used the scanning electron microscopy (SEM) and confocal microscopy, while the mass of the biofilm and the extracellular matrix were quantified by crystal violet and safranin. Lastly was performed the analysis of the protein profile of biofilms with and without treatment. The best minimum inhibitory concentration values (MIC) were obtained for six derivatives of chalcones (T50, C3, E2A, F2A, T18A and T46A) and nonyl protocatechuate (MIC = 3.9 mg/L). The clinical isolate *H. capsulatum* EH317 was able to form biofilms in vitro after 96 hours. After 96 hours, the biofilm reached a maximum value of metabolic activity and produced more biomass and extracellular matrix, when compared to other times. Confocal microscopy revealed an average thickness of mature biofilm 22 micrometers. The nonyl protocatechuate was able to inhibit biofilm formation in concentrations equal to or greater than 3.9 mg / L, whereas in mature biofilm, the same compound caused 90% reduction in metabolic activity in concentrations equal to or higher than 125 mg / L. Confocal microscopy and quantification by crystal violet and safranin of treated biofilms showed a reduction in thickness, biomass and polysaccharide material. Analysis of the

protein profile showed the expression of proteins of different molecular mass in the untreated biofilm when compared to treated. These results contribute to the search for new antifungal drugs and anti-biofilm and raises the protocatecuato nonila of a promising compound.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
ConA	Concanavalina A
CD11/CD18	Linfócitos CD8 e CD18
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CR1	Receptor complemento 1
CR3	Receptor complemento 3
CR4	Receptor complemento 4
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade óptica
DTT	Ditiotreitol
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
PBS	Tampão fosfato/salina
Ph	Potencial hidrogeniônico
RNA	Ácido ribonucleico
Rpm	Rotação por minuto
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
UNAM	Universidade Nacional do México
XTT	2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[carbonilo (fenilamino)]-2H-tetrazólio-hidróxido

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de concentração inibitória mínima (CIM), expressos em mg/L para os derivados de chalconas e para o protocatecuato de nonila contra o isolado clínico de *H. capsulatum* EH317..... 48

Tabela 2. Valores de concentração inibitória mínima (CIM), expressos em mg/L para os derivados de chalconas contra o isolado clínico de *H. capsulatum* EH317..... 48

Tabela 3. Valores de concentração inibitória mínima (CIM), expressos em mg/L para os derivados de chalconas contra o isolado clínico de *H. capsulatum* EH317..... 48

Tabela 4. Valores de concentração inibitória mínima (CIM), expressos em mg/L para os derivados de chalconas contra o isolado clínico de *H. capsulatum* EH317..... 49

Tabela 5. Valores de concentração inibitória mínima (CIM), expressos em mg/L para os derivados de chalconas contra o isolado clínico de *H. capsulatum* EH317..... 49

Tabela 6. Valores de concentração inibitória mínima (CIM), expressos em mg/L para fármaco Itraconazol contra o isolado clínico de *H. capsulatum* EH317 e *C. krusei* ATCC 6258. 49

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura química do Ácido Protocatecuico e seus derivados..... 36
- Figura 2.** Cinética de formação do biofilme de *H. capsulatum* EH 317 em placa de microdiluição a 37 °C. Cada ponto representa a média de quatro medidas de absorbâncias..... 50
- Figura 3.** Quantificação da matriz extracelular no decorrer da formação do biofilme de *H. capsulatum* EH 317. Houve um aumento significativo da matriz após 96 h de crescimento quando comparado aos demais tempos 51
- Figura 4.** Quantificação da biomassa em função do tempo *H. capsulatum* (isolado EH 317) através da coloração com cristal violeta. Apresentou aumento significativo da biomassa após 96 h de crescimento quando comparado aos demais..... 52
- Figura 5.** Microscopia eletrônica de varredura da formação do biofilme de *H. capsulatum* EH 317 após 24h, 48h, 72h e 96h de incubação a 37°C..... 53
- Figura 6.** Microscopia eletrônica de varredura em diferentes magnificações do biofilme de *H. capsulatum* EH 317 após 96 h de crescimento. As setas apontam para a presença de matriz extracelular interligando as leveduras. 54
- Figura 7.** Microscopia confocal do biofilme após 96h de crescimento do isolado clínico *H. capsulatum* EH-317. A Concanavalina A cora a parede celular e a matriz extracelular em verde (A), enquanto FUN 1 cora as células viáveis em vermelho (B). C representa a sobreposição dos dois corantes, enquanto D mostra o corte ortogonal em 3D indicando uma espessura de 25 µm..... 55
- Figura 8.** Efeito do protocatecuato de nonila frente às células planctônicas de *H. capsulatum* EH 317. Os asteriscos indicam redução significativa da atividade metabólica quando comparado ao controle livre de droga..... 57
- Figura 9.** Efeito do protocatecuato de nonila frente ao biofilme maduro de *H. capsulatum* EH 317. Os asteriscos mostram redução significativa da atividade metabólica quando comparado ao controle livre de droga..... 57
- Figura 10.** Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro de *H. capsulatum* EH317 com e sem tratamento com o protocatecuato de nonila. A) mostra o biofilme não tratado; B) indica os biofilmes tratados com nonila na concentração de 31,25 mg/L, enquanto C mostra o biofilme tratado com 62,5 mg/L de nonila. 59

Figura 11. Microscopia confocal de varredura a laser do biofilme de *H. capsulatum* EH317 com e sem tratamento com o protocatecuato de nonila na concentração de 62,5 mg/L. A = controle sem tratamento com espessura de 24,17 µm; B = biofilme tratado, com espessura de 17,1 µm; C = biofilme tratado, com espessura de 14,2 µm..... 61

Figura 12. Quantificação da biomassa após o tratamento com nonila através da coloração por cristal violeta. Houve uma diminuição significativa da absorbância do biofilme tratado com 62,5 mg/L de nonila quando comparada ao biofilme sem tratamento 63

Figura 13. Quantificação da matriz extracelular pela coloração com a safranina após tratamento com o protocatecuato nonila na concentração de 62,5 mg/L 64

Figura 14. SDS-PAGE dos componentes proteicos do biofilme de *H. capsulatum* EH317 sem tratamento (BF) e com tratamento com 15,6 mg/L de nonila (BFT). 66

Figura 15. Perfil protéico dos componentes do biofilme do isolado clínico de *H. capsulatum* EH317 analisado por eletroforese bidimensional usando fita de pH 4-7 e gel de SDS-PAGE de concentração de 12,5%. 67

Figura 16. Visão ampliada das regiões indicadas na eletroforese bidimensional representada na figura 15. (1) Região de separação proteica com massa molecular entre 66 e 45 kDa e ponto isoelétrico de 5.34. (2) Região de separação proteica com massa molecular entre 45 e 30 kDa e ponto isoelétrico de 5.34. 68

Figura 17. Visão ampliada das regiões indicadas na eletroforese bidimensional. (3) Região de separação proteica com massa molecular entre 30 e 20 kDa e ponto isoelétrico de 5.62. (4) Região de separação proteica com massa molecular entre 20 e 14 kDa e ponto isoelétrico de 5.13. 69

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. HISTÓRICO DA HISTOPLASMOSE.....	20
1.2. EPIDEMIOLOGIA DA HISTOPLASMOSE	21
1.3. TAXONOMIA.....	22
1.4. MORFOLOGIA.....	22
1.5. FATORES DE VIRULÊNCIA	23
1.5.1. Termodimorfismo	23
1.5.2. Adesinas.....	23
1.5.3. Parede celular (α - 1,3- glucana)	24
1.5.4. Aquisição de Ferro.....	24
1.5.5. Formação de Biofilme.....	25
1.6. PATOGENIA	26
1.7. TERAPÊUTICA.....	28
1.8. BUSCA DE NOVOS ANTIFÚNGICOS.....	28
1.8.1. Ácido Protocatecuico	29
1.8.2. Chalconas.....	29
1.9. ANÁLISE PROTEÔMICA	30
2. OBJETIVOS.....	33
2.1. OBJETIVOS GERAIS	33
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1. AMOSTRAGEM.....	35
3.2. CULTIVO DE <i>Histoplasma capsulatum</i>	35
3.3. OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS.....	35
3.3.1. Ácido Protocatecuico	35
3.3.2. Chalconas.....	36
3.4. DILUIÇÃO DOS COMPOSTOS	37
3.5. PREPARO DO INÓCULO E AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE <i>H. capsulatum</i> AOS COMPOSTOS PELA TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO	37
3.6. FORMAÇÃO DO BIOFILME.....	37
3.6.1. Determinação da atividade metabólica do biofilme pelo ensaio de redução do XTT	38

3.6.2. Quantificação do biofilme.....	38
3.6.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	39
3.6.4. Microscopia confocal de varredura a laser	39
3.6.5. Efeito dos compostos frente aos biofilmes maduros	40
3.6.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) biofilme tratado	40
3.6.7. Microscopia Confocal de Varredura a Laser do biofilme tratado.....	41
3.6.8. Quantificação do biofilme tratado	41
3.7. ANÁLISE PROTEÔMICA	41
3.7.1. Preparo das amostras	41
3.7.2. Extração total de proteínas.....	42
3.7.3. Precipitação das proteínas	42
3.7.4. Determinação da concentração de proteínas totais: Método de Bradford.....	42
3.7.5. Análise do perfil protéico por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	43
3.7.6. Reidratação das fitas	44
3.7.7. Focalização Isoelétrica (IEF) – Primeira Dimensão.....	44
3.7.8. Equilíbrio das fitas	44
3.7.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) - Segunda Dimensão	44
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
4. RESULTADOS	47
4.1. AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE <i>H. capsulatum</i> FRENTE A COMPOSTOS DERIVADOS DE CHALCONA E DO ÁCIDO PROTOCATECUICO PELA TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO	47
4.2. ENSAIO DE FORMAÇÃO DO BIOFILME	50
4.2.1. Determinação da atividade metabólica do biofilme	50
4.2.2. Quantificação da matriz extracelular pela coloração com safranina.....	51
4.2.3. Quantificação da biomassa pela coloração com Cristal Violeta	52
4.2.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	53
4.2.5. Microscopia Confocal de Varredura a Laser.....	55
4.2.6. Avaliação da susceptibilidade da forma de crescimento planctônico frente ao protocatecuato de nonila.....	56

4.2.7. Avaliação da susceptibilidade do biofilme maduro frente ao protocatecuato de nonila	56
4.2.8. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do biofilme tratado.....	58
4.2.9. Microscopia Confocal de Varredura a Laser do biofilme tratado.....	60
4.2.10. Quantificação da biomassa após o tratamento através da coloração por cristal violeta	63
4.2.11. Quantificação da matriz extracelular do biofilme pós-tratamento através da coloração com safranina	64
4.3. ANÁLISE PROTEÔMICA	65
4.3.1. Análise do perfil proteico por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	65
4.3.2 Perfil proteico por Eletroforese bidimensional	67
5. DISCUSSÃO.....	73
6. CONCLUSÕES	82
7. BIBLIOGRAFIA	84

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. HISTÓRICO DA HISTOPLASMOSE

A histoplasmose foi descrita pela primeira vez no ano de 1905 por Samuel Taylor Darling, ao observar a presença de numerosos corpos arredondados e ovais no interior de macrófagos alveolares em materiais de necrópsia. O novo microrganismo recebeu o nome de *Histoplasma capsulatum* por estar presente no interior de histócitos (DARLING, 1906). Sua natureza fúngica foi observada por Rocha Lima em 1912 que, após vários estudos concluiu que tratava-se de um processo micótico. Posteriormente, em 1934, De Monbreun foi o pioneiro em realizar o crescimento do fungo na forma filamentosa e produzir infecção em animais de laboratório a fim de verificar a transição para a fase leveduriforme, comprovando assim, o dimorfismo do fungo (DE MONBREUN, 1934).

Nos anos de 1939 e 1940, o fungo foi isolado pela primeira vez no Brasil em material de necrópsia e em amostra de escarro de um paciente (ALMEIDA & LACAZ, 1941). De sua descoberta até 1945, a histoplasmose era conhecida como uma doença rara, quase sempre fatal e de transmissão desconhecida, porém, após um estudo de Christie e Peterson (1945), a doença passou a ser considerada uma enfermidade benigna e de contaminação por via inalatória. Esse estudo revelou ainda a presença de calcificações pulmonares histoplasmina-positivas e tuberculino-negativas nos pacientes.

Em 1947, *H. capsulatum* foi isolado pela primeira vez de roedores (EMMONS et al., 1947). Cinco anos mais tarde, Zeidberg e colaboradores (1952) relataram o crescimento do fungo em solo rico em matéria orgânica. Nesse estudo, as amostras foram coletadas em diferentes locais onde residiam pacientes positivos para a histoplasmina. As maiores porcentagens de isolamento de *H. capsulatum* foram obtidas nas zonas de maior concentração de dejetos de aves. A relação com fezes de morcegos foram descritas por Shacklette e colaboradores (1962), na região do Panamá ao isolarem o fungo a partir do fígado e do baço de morcegos insetívoros.

No Brasil, próximo aos anos sessenta, diversas microepidemias foram relatadas onde os fatores predisponentes mais comuns eram visitas em grutas colonizadas por morcegos, minas abandonadas e galinheiros (OLIVEIRA et al., 2006). Nas próximas décadas, com o surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), centenas de casos foram observados, tornando essa micose um importante problema de saúde mundial (DAHER et al., 2006). Faiolla e colaboradores (2013) relataram uma distribuição desigual da histoplasmose no Brasil, com maior incidência da doença no estado de São Paulo e nas regiões nordeste e sudeste de Minas Gerais.

1.2. EPIDEMIOLOGIA DA HISTOPLASMOSE

O fungo *H. capsulatum* é endêmico em determinadas regiões das Américas, onde a doença está associada a surtos frequentes, apesar de descrita em mais de 50 países (TAYLOR et al., 2009). A histoplasmose apresenta maior prevalência em zonas tropicais e temperadas, estando presente nas regiões central e sul dos Estados Unidos e em países da América Central (México, Honduras, Guatemala, Nicarágua, Panamá) e América do Sul (Venezuela, Colômbia, Peru, Brasil, Argentina e Uruguai). Casos esporádicos da doença foram relatados na África, Ásia e Europa (ROSSINI & GOULART, 2006; FERREIRA & BORGES, 2009).

Epidemias de histoplasmose no Brasil têm ocorrido em áreas endêmicas e não-endêmicas após a exposição a ambientes infectados como grutas habitadas por morcegos, galinheiros, pombais ou casas desabitadas (ROSSINI & GOULART, 2006). De acordo com Aidé (2009) foram registradas 26 microepidemias em oito estados brasileiros: Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, São Paulo, Distrito Federal, Minas Gerais, Paraíba, Amazonas e Bahia.

O teste cutâneo da histoplasmina foi utilizado como referência para a detecção de áreas endêmicas no Brasil, com destaque para as regiões Centro-Oeste e Sudeste do país, onde a prevalência variou de 4,4 – 63,1% e 3,0 – 93,2%, respectivamente (GUIMARÃES, NOSANCHUK & ZANCOPÉ-OLIVEIRA, 2006).

Estudos recentes realizados por Deus Filho e colaboradores (2009), revelaram a ocorrência de histoplasmose nos estados do Maranhão e Piauí, indicando a existência de microfocos nessas regiões. Brilhante e colaboradores (2012) apresentaram 208 casos de histoplasmose em indivíduos com SIDA no estado do Ceará, no período de 2006 a 2010.

1.3. TAXONOMIA

O fungo *H. capsulatum* pertencente ao Reino Fungi, filo Ascomyta, classe Eurotiomycetes, ordem Onygenales, família Ajellomycetaceae (LACAZ et al., 1998; KASUGA et al., 2003). Apresenta três variedades em relação à sua morfologia e patogenicidade: *H. capsulatum* var. *capsulatum*; *H. capsulatum* var. *duboisii* e *H. capsulatum* var. *farciminosum*. Apenas as variedades *H. capsulatum* var. *capsulatum* e *H. capsulatum* var. *duboisii* são patogênicas ao homem, sendo que a última é endêmica apenas nas regiões oeste e central da África e Ilha de Madagascar. A variedade *H. capsulatum* var. *farciminosum* até o momento não foi encontrada parasitando o homem e foi descrita como causa de linfangite epizoótica apenas em cavalos e mulas em regiões da Europa, Ásia e África. (GUGNANI & MUOTOE-OKAFOR, 1997; LACAZ et al., 2012).

1.4. MORFOLOGIA

O fungo *H. capsulatum* possui termodimorfismo, apresentando duas formas distintas de crescimento. Na natureza ele é encontrado no solo, principalmente os enriquecidos com fezes de pássaros e morcegos, na forma filamentosa ou miceliar (forma infectante). Nessa fase, apresenta duas formas de propagação: macroconídios redondos com paredes espessas e tuberculadas, medido de 8 a 15 µm e microconídios arredondados ou ovaladas de paredes lisas, medindo em torno de 2 a 4µm (FERREIRA & BORGES, 2009).

A forma leveduriforme (parasitária) é caracterizada por estruturas arredondadas ou ovaladas, medindo em torno de 2 a 4 µm que são encontradas preferencialmente no interior das células de mamíferos (ROONEY et al., 2001; AIDÉ, 2009).

A conversão da fase miceliar para leveduriforme é regulada pela temperatura, embora outros fatores nutricionais também sejam importantes. Essa transição é essencial para sua virulência (WOODS, 2002; CAMPBELL et al., 2010).

1.5. FATORES DE VIRULÊNCIA

O fungo apresenta determinados mecanismos que permitem seu crescimento diante das condições hostis impostas pelo hospedeiro, além disso, esses fatores favorecem a relação parasitária, que por sua vez contribuem para o processo da patologia (KUROKAWA et al., 1988).

1.5.1. Termodimorfismo

De acordo com Medoffe (1987), a transformação da fase miceliar para a leveduriforme é essencial para o estabelecimento do processo patológico. Essa transformação não resulta apenas na mudança da morfologia da célula, mas também na modificação da composição da parede, antígenos e expressão de genes de virulência (TEBBETS, 2007).

Estudos recentes com abordagens genéticas revelaram possíveis mecanismos que controlam a conversão de *H. capsulatum* para levedura e a expressão de genes relacionados à patogênese. Em fungos dimórficos, a quinase DKR1 é responsável pela conversão das fases, sendo que em mutantes desse gene não ocorre a transição para fase leveduriforme (HOLBROOK & RAPPLEYE, 2008). Medoff e colaboradores (1986) demonstraram que as cepas mais virulentas realizam a conversão de maneira mais rápida e são mais resistentes a variações drásticas de temperatura.

1.5.2. Adesinas

Durante a infecção pulmonar, *H. capsulatum* é encontrado no interior dos macrófagos, visto que sua sobrevivência no meio extracelular está comprometida por

ação das proteínas SP-A SP-D, presentes no surfactante pulmonar (MCCORMACK et al., 2003). O fungo apresenta em sua superfície adesinas que permitem especificamente a sua entrada e sobrevivência no interior dos fagócitos (HOLBROOK & RAPPLEYE, 2008).

A HSP60 é uma proteína de choque térmico, localizada normalmente no citosol, que auxilia no dobramento e montagem correta das proteínas (HOLBROOK & RAPPLEYE, 2008). Essa proteína é uma adesina e está presente na superfície da célula de *H. capsulatum*. Além disso, ela é responsável pela ligação ao receptor CR3 do sistema de complemento dos fagócitos do hospedeiro, resultado em rápida fagocitose, aumentando sua sobrevivência e replicação no interior das células (NEWMAN et al., 1990). Bullock & Wright (1987) revelaram que as ligações a esse e outros receptores como CR4 e CR1, aparentemente são a principal fonte de ligação entre *H. capsulatum* e macrófagos.

1.5.3. Parede celular (α - 1,3- glucana)

A parede celular do fungo na fase filamentosa apresenta predominantemente β - 1,3- glucana, que é responsável pelo recrutamento de leucócitos, regulação de mediadores inflamatórios e citocinas pró inflamatórias (KUOKAWA et al., 1998). Segundo Rappleye e colaboradores (2007), *H. capsulatum* na forma leveduriforme produz uma camada de α - 1,3- glucana na parte mais externa da sua parede celular, causando interferência na ativação das células do sistema imune, permitindo assim sua permanência dentro dos fagolisossomos. A presença dessa camada em sua parede está diretamente relacionada à sua virulência e patogenicidade.

1.5.4. Aquisição de Ferro

No interior dos fagócitos as concentrações de ferro são limitadas, visto que, esse mineral essencial para a levedura o *H. capsulatum* apresenta mecanismos de aquisição

desse elemento para a sobrevivência e proliferação (WOODS et al., 2002). O ferro apresenta-se como um nutriente essencial tanto para o hospedeiro quanto para os patógenos microbianos, sendo que uma forma de defesa da ação microbiana é a limitação desse elemento (WEINBERG, 1999). Na fase aguda da doença, o hospedeiro apresenta como resposta ao estresse, uma redução nos níveis de saturação da proteína transferrina e a regulação dos seus receptores na membrana celular. O controle sobre a proteína e seus receptores causa uma diminuição nos níveis de ferro intracelular e, conseqüentemente, a privação de ferro para o patógeno intracelular (BYRD & HORWITZ, 1989).

Devido à importância da aquisição de ferro, o *H. capsulatum* desenvolveu alguns mecanismos que permitem seu crescimento dentro desse ambiente. Um desses mecanismos é a produção de sideróforos, compostos com alta afinidade pelo ferro, responsáveis por retirar esse elemento das proteínas carreadoras e liberá-los no citoplasma (HILTY et al., 2011). Outro modo de aquisição do ferro pelo fungo é através da acidificação do pH, promovendo a liberação do ferro ligado à transferrina (LÓPEZ et al., 2006).

1.5.5. Formação de Biofilme

Recentemente, a capacidade de formação de biofilmes por *H. capsulatum* foi caracterizada pelo nosso grupo e esta forma de crescimento pode estar correlacionada ao modo de infecção em macrófagos e pneumócitos (PITANGUI et al., 2012).

Biofilmes são comunidades de microrganismos nas quais as células se fixam irreversivelmente a uma superfície ou interface e estão embebidas em uma matriz extracelular polimérica. Essas comunidades apresentam novas características fisiológicas como alteração na taxa de crescimento e a transcrição de genes que não são expressos nos organismos planctônicos (DONLAN & COSTERTON, 2002).

O processo de formação do biofilme inicia-se com a adesão reversível, na qual as células planctônicas, através de interações físico-químicas como forças eletrostáticas e de Van der Waals aderem sobre a superfície de um biomaterial ou célula hospedeira (DAVIES et al., 2003; WORTHINGTON et al., 2012). Posteriormente, o microrganismo consolida sua fixação por ação de adesinas e formam um complexo exopolissacarídico. Nessa fase a adesão é irreversível. (KOSTAKIOTI et al., 2013). Rendueles e colaboradores (2012) relataram que as células aderidas irreversivelmente são susceptíveis a agentes antimicrobianos. A produção do complexo exopolissacarídico promove a formação da matriz extracelular, que além de ser composta por polissacarídeos, também compreende uma grande variedade de proteínas, fosfolipídios, lipídios (FLEMMING et al., 2007; ESTRELA et al., 2009). A maturação do biofilme pode ser observada pelo aumento da matriz extracelular devido à continua secreção de exopolissacarídico (TARASZKIEWICZ et al., 2013). Com a formação completa do biofilme, é possível observar canais aquosos que permitem o transporte de água, nutrientes, metabólitos, a passagem de células planctônicas, bem como a remoção de metabólitos potencialmente tóxicos (MONDS et al., 2009). No entanto, as células presentes na camada mais profunda do biofilme, permanecem em estado de dormência e se dividem infreqüentemente (DAVIES et al., 2003).

1.6. PATOGENIA

A Histoplasmose é adquirida inicialmente pela inalação dos propágulos infectantes do fungo presentes no solo, principalmente os solos enriquecidos com fezes de aves e morcegos. Uma vez inalados, os propágulos chegam até os alvéolos pulmonares, onde há o desencadeamento uma resposta inflamatória no hospedeiro e o recrutamento de células de defesa. Ao entrar no pulmão, devido à mudança de temperatura, mudanças genéticas, bioquímicas e físicas são sofridas pelo microrganismo e sua conversão para a fase de levedura ocorre no parênquima pulmonar (DEEPE, 1998). A evolução dessa micose respiratória depende da capacidade das leveduras de *H. capsulatum* sobreviverem e replicarem dentro dos macrófagos alveolares. Os receptores CD11/CD18 presentes na superfície dos macrófagos ligam-se avidamente às células de levedura e as fagocitam. (NEWMAN, 1999).

Estudos conduzidos por Ferreira e Borges (2009) relataram que a extensão da doença é determinada pela resposta imunológica do paciente contra a infecção, entretanto, a quantidade de inóculo inalado e a virulência fúngica também têm sua importância. Em indivíduos imunossuprimidos não ocorre uma resposta inflamatória eficiente o bastante para impedir a disseminação do microrganismo. O fungo em momento oportuno se dissemina a partir do pulmão invadindo os linfonodos hilo-mediastinais e consequentemente atingindo a corrente sanguínea, permitindo assim que o agente parasite outros órgãos.

A histoplasmose apresenta desde uma infecção assintomática até uma doença disseminada. Sua apresentação clínica é proporcional ao tempo de exposição do paciente aos propágulos infectantes do fungo, idade, estado imunológico do hospedeiro, a presença de doença pulmonar crônica anterior à infecção fúngica e a virulência da cepa infectante (AIDÉ, 2009).

Zaitz e colaboradores (2010) relataram que 95% dos casos de histoplasmose são assintomáticos e de resolução espontânea, além disso, menos de dois terços dos infectados desenvolve calcificações nodulares pulmonares.

Quando o nível de exposição é baixo, o indivíduo manifesta uma doença caracterizada como uma gripal leve, geralmente com duração superior a um mês. A histoplasmose pulmonar crônica é observada em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica de base, do sexo masculino idosos e é caracterizada por tosse produtiva, dor torácica, dispnéia progressiva e febre. Uma forma mais grave é a histoplasmose disseminada, que está associada a fatores de imunossupressão grave, sendo caracterizada por evolução aguda, febre, com grande frequência de lesões orocutâneas em pacientes com SIDA, entre outras manifestações como anorexia, linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia, lesões pulmonares e comprometimento da medula óssea (ZAITZ et al., 2010).

Segundo Kauffman, (2007), indivíduos residentes em áreas endêmicas podem permanecer com focos latentes do fungo viáveis em vários órgãos e, muitas vezes, não é possível saber com certeza se a doença se trata de uma infecção antiga, ou nova.

1.7. TERAPÊUTICA

A escolha do tratamento da histoplasmose depende de dois fatores: o grau de evolução da doença e o estado imune do paciente. Casos de regressão espontânea não necessitam de tratamento específico (AIDÉ, 2009). Os fármacos eficazes e disponíveis compõem diferentes opções terapêuticas, entre elas: a anfotericina B deoxicolato, destinados ao tratamento de formas graves, pulmonares ou disseminadas; a anfotericina B lipossomal, para formas graves ou disseminadas quando não for possível a administração de anfotericina B deoxicolato; itraconazol, para o tratamento de formas leves a moderadas, sendo útil também na manutenção pós-anfotericina B; voriconazol e posaconazol, medicamentos eficazes que podem ser reservados para tratamentos de resgate (ZAITZ *et al.*, 2010). Entretanto, alguns pacientes apresentam intolerância ao itraconazol, necessitando o uso de terapias alternativas, como exemplo, o uso de voriconazol.

1.8. BUSCA DE NOVOS ANTIFÚNGICOS

Devido à semelhança da célula fúngica com a célula dos mamíferos e à consequente toxicidade dos antifúngicos disponíveis comercialmente, há a necessidade da descoberta de novos agentes antifúngicos. Estes devem apresentar algumas propriedades ideais, entre elas a seletividade para o alvo, ser atóxico para o hospedeiro, ter meia vida longa no plasma, baixa ligação às proteínas plasmáticas, ausência de interferência com outros fármacos, entre outras características (MIMS *et al.*, 1999; LACAZ *et al.*, 2002; ZACCHINO *et al.*, 2003).

Os produtos naturais são excelentes candidatos a agentes antifúngicos devido ao seu amplo espectro de atividades biológicas. Nos países desenvolvidos, 30% dos

medicamentos produzidos são provenientes de recursos naturais (SIXEL & PECINALLI, 2002; NEWMANN, CRAGG & SNADER, 2003).

1.8.1. Ácido Protocatecuico

Compostos derivados do ácido protocatecuico vêm sendo testados pelo nosso grupo obtendo excelentes resultados contra *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii*, *Candida* spp. e *Paracoccidioides brasiliensis*. O ácido protocatecuico é um composto fenólico, derivado do ácido benzoico e é encontrado em alimentos, frutas, nozes e vegetais (SOARES et al., 2014). Sua presença foi relatada em diversas espécies de vegetais: nas flores de *Hibiscus sabdariffa* (LIN et al., 2003); no óleo de girassol (HRÁDKOVÁ et al., 2013); no óleo de açaí (*Euterpe oleracea*) (PACHECO-PALENCIA, MERTENS-TALCOTT & TALCOTT, 2008); no alho (LIU, HSU & YIN, 2008); em plantas da família Lamiaceae (orégano, erva-cidreira) (KWON, VATTEM & SHETTY, 2006), *Eucommia ulmoides* (LIN et al., 2012).

1.8.2. Chalconas

Chalconas são compostos derivados de plantas, pertencentes à família dos flavonoides e classificadas como polifenóis de cadeia aberta. Nas plantas, esses compostos apresentam funções relacionadas ao crescimento e proteção contra microrganismos e insetos. (ZUANAZZI, 2001; SIMÕES et al., 2006). Além disso, são relatadas diversas atividades biológicas, como atividades anti-inflamatórias, antioxidantes, antitumorais e antimicrobianas (PRASHAR, 2012). Estudos recentes conduzidos por Brandão e colaboradores (2010), comprovaram as atividades antibacteriana e antiviral desses compostos. Além disso, foi relatado que as chalconas derivadas do gênero *Glycyrrhiza* e *Alpinia* apresentaram uma potente redução no processo inflamatório (PRASAD et al., 2010). Gullo (2012) relatou uma diversidade de chalconas que apresentaram ação fungistática contra isolados de *Cryptococcus*

neoformans de virulência acentuada. Essas chalconas inibiram a adesão do fungo às células pulmonares e células de glioma humano.

Um possível mecanismo de ação antifúngica desses compostos foi demonstrado por Sivakumar e colaboradores (2007). Nesse estudo, foi identificada uma inibição da síntese de 1,3- β -D glucana, impedindo a formação de parede celular. Outro possível mecanismo de ação desses compostos é através da inibição da enzima glutathione-S-transferase, a qual parece estar relacionada ao processo de resistência antifúngica (BATOVSKA et al., 2007; LAHTCHEV et al., 2008; DIORGENES, 2012).

1.9. ANÁLISE PROTEÔMICA

A abordagem proteômica tem sido utilizada para elucidar mecanismos de ação de compostos antifúngicos, novos alvos terapêuticos e também para estabelecer alguns fatores envolvidos na patogênese de alguns fungos (ALBUQUERQUE et al., 2008; RODRIGUES et al., 2008; SANGALLI, 2010; HOLBROOK et al., 2011).

A palavra proteoma foi introduzida nos anos 90 por Wilkins, com o objetivo de demonstrar as proteínas totais e complementares expressas pelo genoma de uma célula, tecido ou organismo. O proteoma de uma célula varia conforme o momento ou evento metabólico pelo qual o organismo esteja submetido. Além disso, é muito complexo e composto por inúmeras proteínas (WILKINS, et al., 1996; SANGALLI, 2010). Essa análise tem como objetivo obter uma visão mais completa e integrada da biologia celular, estudando o proteoma total ou especificamente cada proteína da célula (GRAVES & HAYSTEAD, 2002; PITANGUI, 2012).

O emprego dessa técnica possui um papel importante na descoberta de novos antifúngicos, uma vez que é possível analisar as alterações ocorridas quando o organismo é exposto a um determinado composto, gerando proteínas específicas para determinada situação e levando a um possível mecanismo de ação. (WALGREN & THOMPSON, 2004; SANGALLI, 2012). Essa metodologia é amplamente utilizada e

requer uma separação de proteínas pela eletroforese bidimensional ou 2-DE. Na eletroforese bidimensional, as proteínas são separadas em uma primeira dimensão (focalização isoeletrica), de acordo com sua carga para, em seguida, serem separadas pela sua massa molecular (SDS PAGE), na segunda dimensão. Por fim, as proteínas são identificadas em espectrômetro de massas e caracterizadas através da utilização de um banco de dados KLOSE & KOBALZ,1995; WASHBURN et al., 2001; PITANGUI, 2012).

Tendo em vista o aumento das infecções fúngicas, principalmente as causadas por linhagens resistentes aos antifúngicos disponíveis comercialmente e à semelhança da célula fúngica com as células dos mamíferos, há a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos mais específicos e menos tóxicos. Além disso, a descoberta da formação de biofilmes pelos fungos é relativamente recente. Pouco se sabe sobre a capacidade de formação de biofilmes *in vitro* por linhagens e isolados clínicos e ambientais de *H. capsulatum* e sobre os mecanismos envolvidos na sua formação. A análise proteômica permite avaliar a expressão de proteínas, as quais seriam alvos interessantes para interferência do crescimento destas formas. Assim, também seria possível desenvolver moléculas com ação anti-biofilmes, uma vez que esta forma de crescimento confere resistência e aumento da virulência. Os antifúngicos usados na terapia convencional contra biofilmes necessitam de doses elevadas para perfusão destes fármacos e apresentam-se tóxicos para os pacientes. Portanto, o presente trabalho pretendeu caracterizar o biofilme do isolado clínico de *H. capsulatum* EH317 e verificar a ação de 92 compostos sob as formas de crescimento planctônico e biofilme e identificar possíveis alvos proteicos nos biofilmes tratados.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Caracterizar a formação de biofilme pela cepa *H. capsulatum* EH 317; realizar uma triagem de novos compostos contra as formas planctônica e biofilme e realizar a análise proteômica do biofilme com e sem tratamento.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar e caracterizar a formação de biofilme pela cepa *H. capsulatum* EH 317 quanto à sua aderência, espessura, atividade metabólica, produção de matriz extracelular e biomassa;
- Avaliar a sensibilidade *in vitro* da cepa de *H. capsulatum* EH 317 contra derivados de chalconas e do ácido protocatecuico;
- Avaliar a sensibilidade *in vitro* das células dos biofilmes em formação e pré-formados de *H. capsulatum* EH 317 contra o composto que apresentou melhor atividade anti-histoplasma;
- Realizar a análise proteômica dos biofilmes tratados e não tratados.

Material e métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. AMOSTRAGEM

Para a realização desse trabalho foi utilizado o isolado clínico de *H. capsulatum* EH317, proveniente de sangue de paciente com SIDA, da cidade de Morelos, no México, gentilmente cedida pela Profa. Dra. Maria Lúcia Taylor da Universidade Nacional do México (UNAM). Esta cepa é pertencente à coleção do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Escola de Medicina da UNAM e é registrada no banco de dados da federação mundial para coleções de cultura sob o número LIH-UNAM WDCM817.

3.2. CULTIVO DE *Histoplasma capsulatum*

O isolado clínico foi cultivado em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*), suplementado com 0,1% de cisteína e 1% de glicose e incubado a 37°C durante 48 horas sob agitação (80 rpm).

3.3. OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS

Os compostos derivados de chalcona e do ácido protocatecuico foram cedidos em colaboração com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Luís Octávio Regasini do Instituto Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP- São José do Rio Preto, SP.

3.3.1. Ácido Protocatecuico

Inicialmente, o ácido protocatecuico foi isolado da planta *Cupania oblongifolia* (Pau magro) através dos projetos BIOTA-FAPESP e Sisbiota CNPq. Esse composto sofreu reações de esterificação, originando diversos derivados (**Fig.1**)

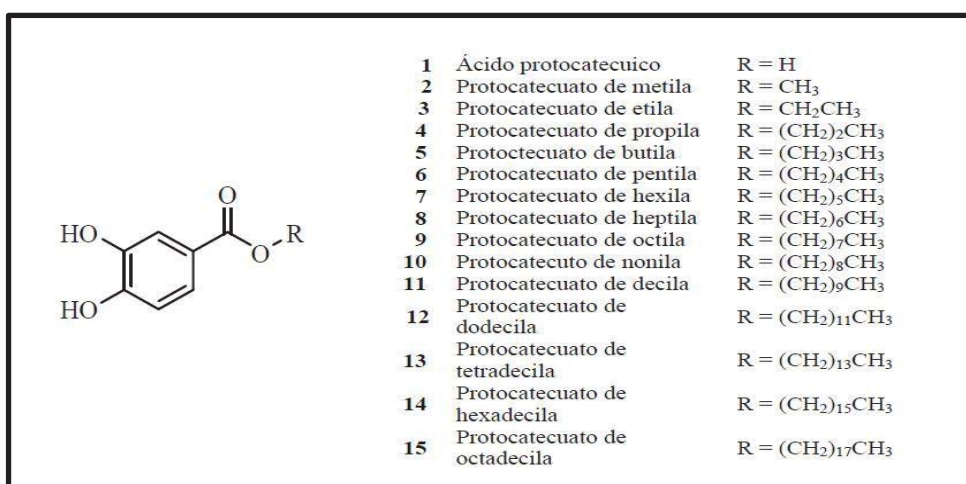


Figura 1. Estrutura química do Ácido Protocatecuico e seus derivados (SOARES, 2011).

Atualmente, o ácido protocatecuico é adquirido do fabricante *Sigma Aldrich* e os seus derivados passaram a ser totalmente sintéticos (SOARES et al., 2014). Nesse trabalho foi utilizado apenas o protocatecuato de nonila por ter exibido excelente atividade ao ser testado contra diversas espécies fúngicas pelo nosso grupo, bem como, por ter tido excelente atividade anti- biofilme de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* (COSTA-ORLANDI, 2015 – não publicado).

3.3.2. Chalconas

Foram testados 92 derivados de chalcona, cuja síntese ainda permanece em sigilo: T50, C3, E2A, F2A, T18A, T46A, T19, T51, B4, T25, T41, B6, T4, T39, B1, T45, T17, T21, T24, T41A, T42, T51A, CH4, D3, J4, A5, A2, T20, T25A, T28, T39, T44, D2, T23, T17, A17, G21, D1, D21, A3, J6, J20, T1, T3, D6, G4, G5, G6, G14, G15, G18, T30, T45, T50, CH3, G19, G20, G23, G24, G25, D2A, D23, D24, D25, A1, A4, G15, A20, A13, A14, A15, A18, A19, T38, A6, A7, A8-1, A8-2, A10, A11, A12, D3, D4, D5, D14, D15, D20, G2, G3, T18, E1, T47.

3.4. DILUIÇÃO DOS COMPOSTOS

O protocatecuato de nonila e os análogos de chalcona foram solubilizados assepticamente em dimetilsulfóxido (DMSO). Os compostos com massa superior a 5 mg foram solubilizados s em 1 mL de DMSO e os inferiores a 5 mg em 0,5 mL de DMSO. Os compostos foram diluídos nos meios RPMI-1640 suplementado com 2% de glicose, de modo que a concentração inicial na placa de microdiluição fosse de 500 µg/ mL. Em seguida, foram feitas diluições seriadas até que a concentração final fosse de 0.92 µg/ mL.

O fármaco Fluconazol foi utilizado como controle e preparado conforme descrito no documento M27-A3.

3.5. PREPARO DO INÓCULO E AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE *H. capsulatum* AOS COMPOSTOS PELA TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO

Os testes de susceptibilidade do isolado clínico de *H. capsulatum* EH317 em sua forma leveduriforme foram realizados de acordo com o documento M27-A3, proposto pelo CLSI em 2008, com modificações. Para o preparo do inóculo, o fungo foi cultivado em caldo BHI suplementado com 0.1% de cisteína e 1% de glicose a temperatura de 37°C. Em seguida, foi realizada uma suspensão e contagem no hematocitômetro, de modo a obter uma concentração final na placa de microdiluição de 2.5×10^3 . As placas foram montadas adicionando 100µL do inóculo e 100µL do composto em cada poço, correspondente a cada concentração, além dos controles positivos (controle do crescimento fúngico) e negativos (controle de esterilidade do meio). Por fim, as placas foram incubadas a 37°C, sob agitação (80 rpm), durante 48 horas. As placas foram reveladas com a adição de 20µL de Alamar Blue® em cada poço. Como controle de qualidade da metodologia foi utilizada a cepa de *Candida krusei* ATCC 6258.

3.6. FORMAÇÃO DO BIOFILME

O ensaio de formação do biofilme foi realizado conforme descrito por Pitangui e colaboradores (2012), com algumas modificações. O fungo foi cultivado em caldo BHI

suplementado com 0.1% de cisteína e 1% de glicose e incubado a 37°C, por 48 horas, sob agitação. Em seguida, as leveduras foram suspensas em tampão fosfato salina (PBS) 0.01M pH 7.2, contadas em hematocitômetro e a suspensão foi ajustada de modo a obter uma concentração final de 5×10^6 células/mL. Os biofilmes foram formados em placas de 24 e 96 poços. Para as placas de 24 poços, foram adicionados 1000 µL do inóculo, enquanto para as placas de 96 poços, foram adicionados 200 µL. As placas foram então incubadas a 37 °C, a 80 rpm, por 7 horas, até que houvesse a pré-adesão das células na superfície de poliestireno. Após esse período, o sobrenadante foi removido e os poços foram lavados com PBS estéril por 3 vezes para que houvesse remoção das células não aderentes. Após a lavagem, foi adicionado caldo BHI suplementado com 0,1% de cisteína e 1% de glicose e as placas foram novamente incubadas por até 168 horas.

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

A atividade metabólica do biofilme por *H. capsulatum* foi determinada através do ensaio de redução do XTT - 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5 - [carbonilo (fenilamino)] -2H-tetrazólio-hidróxido (XTT). Foi preparada uma solução estoque (1 mg/mL em PBS) e menadiona (1 mM em etanol). Em seguida, 50 µL de solução de XTT + 4 µL de solução de menadiona adicionados a cada poço. As placas de microtitulação foram incubadas a 37°C por 3 horas. Atividade da desidrogenase mitocondrial fúngica reduz o sal de tetrazólio XTT a sais de formazana, resultando em alteração colorimétrica que se correlaciona com a viabilidade celular. A mudança colorimétrica foi lida em leitor de ELISA em um comprimento de onda de 490nm (MARTINEZ & CASADEVALL, 2006; PITANGUI et al., 2012; COSTA-ORLANDI et al., 2014).

3.6.2. Quantificação do biofilme

3.6.2.1. Quantificação da matriz extracelular pela coloração de Safranina

A matriz extracelular produzida pelo biofilme foi quantificada pela coloração com safranina como descrito por Seidler e colaboradores (2008) e Costa-Orlandi e colaboradores (2014). A quantificação foi realizada nos tempos de 24, 48, 72 e 96h em

placa de 96 poços. Após a remoção do meio e lavagem com PBS, a matriz extracelular foi corada com a adição de 50 µL de solução de safranina 1%, por cinco minutos. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS até que o sobrenadante ficasse límpido. Por fim, as placas foram lidas em leitor de ELISA em um comprimento de onda de 492 nm.

3.6.2.2. *Quantificação da massa por coloração Cristal Violeta*

A massa produzida pelo biofilme foi quantificada pela coloração com cristal violeta como descrito por Mowat e colaboradores (2007) e Costa-Orlandi e colaboradores (2014). A quantificação foi realizada nos tempos de 24, 48, 72 e 96h em placa de 96 poços. Após remoção do meio e lavagem com PBS, foram adicionados 100 µL de solução de cristal de violeta a 0,5%, durante cinco minutos. Os poços foram lavados com água destilada estéril até a remoção do excesso de corante. Em seguida, os biofilmes foram descorados pela adição de 100 µL de uma solução de etanol a 95% a cada poço. A solução de etanol foi suavemente homogeneizada até que o restante do cristal violeta fosse completamente dissolvido. Por fim, o conteúdo dos poços foi transferido para outra placa de microdiluição, que foi lida em leitor de ELISA em comprimento de onda de 570 nm.

3.6.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a MEV, os biofilmes pré-formados foram processados conforme descrito por Pitangui e colaboradores (2012) com modificações. Inicialmente, as amostras foram lavadas três vezes com PBS para remoção das células não aderentes e fixadas com solução de glutaraldeído (*Sigma-Aldrich*) 2.5% por 18 horas. Após esse período, as amostras foram lavadas e desidratadas com concentrações crescentes de etanol (25% a 100%). As amostras foram secas em dessecador, revestidas com ouro e analisadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6610LV, na Faculdade de Odontologia da UNESP - Araraquara.

3.6.4. Microscopia confocal de varredura a laser

Para a microscopia confocal foi preparada uma solução de ConA (Concanavalina A – conjugada à Alexa fluor 488 – *Molecular Probes*) e FUN 1 (*Molecular Probes*, USA). Dessa forma, foram adicionados 4µL de FUN 1 10mM e 15µL de CAAF 488 5mg/mL em 3 mL de PBS estéril, obtendo as seguintes concentrações de 10mg/L de FUN 1 e 25mg/L de CAAF. A seguir, a mistura foi adicionada aos poços contendo as lamínulas com o biofilme, e as placas foram incubadas por 45 minutos, a 37°C ao abrigo da luz. Decorrido esse tempo, as lamínulas foram lavadas com água destilada, retiradas dos poços e vertidas sobre 4 µL de Fluoromount-G (*Sigma-Aldrich*) (PITANGUI et al., 2012). As imagens foram obtidas em microscópio confocal *Leica TCS SP5* (*Leica Microsystems*, *Wetzlar*, Alemanha).

3.6.5. Efeito dos compostos frente aos biofilmes maduros

A capacidade dos compostos com melhor atividade anti-*Histoplasma* de causar danos aos biofilmes maduros foi verificada. A formação do biofilme de *H. capsulatum* foi realizada como descrito no item 3.6. Os biofilmes foram formados em placas de 96 poços e os compostos foram testados no intervalo de concentração de 500 – 0.92 mg/L. As placas foram incubadas a 37°C, sob agitação de 80 RPM, por 96h. Após esse período, o meio foi retirado, as células foram lavadas e a atividade metabólica dos biofilmes tratados foi quantificada através do ensaio de redução do XTT, como descrito por Pierce e colaboradores (2008).

3.6.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) biofilme tratado

Para uma visualização mais detalhada da ação do composto sobre biofilme *in vitro* de *H. capsulatum*, foi realizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV). O biofilme foi formado em placa de 24 poços e após sua maturação, foi colocado em contato com o composto nas concentrações que causaram maior redução da atividade metabólica no item 3.6.5. Após o tratamento, foi realizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV) como descrita no item 3.6.3.

3.6.7. Microscopia Confocal de Varredura a Laser do biofilme tratado

O biofilme maduro tratado foi observado em microscópio confocal, como descrito no item 3.6.4.

3.6.8. Quantificação do biofilme tratado

A ação do composto sobre a produção de matriz extracelular e biomassa do biofilme foi quantificada através da coloração por safranina e cristal violeta respectivamente. Após 96h de ação do composto sobre o biofilme maduro, as quantificações foram realizadas como descritas no item 3.6.2.1 e 3.6.2.2.

3.7. ANÁLISE PROTEÔMICA

3.7.1. Preparo das amostras

A análise proteômica diferencial foi realizada sob duas condições diferentes de crescimento de *H. capsulatum* (EH 317): biofilme e biofilme com tratamento. Todas as formas foram cultivadas em placas de 24 poços, à temperatura de 37°C, por 192 horas.

As células foram contadas em hematocitômetro de modo a obter uma concentração final em cada poço de 5×10^6 células/mL. Os biofilmes foram formados e tratados conforme descrito nos itens 3.6 e 3.6.5. A concentração do composto utilizado para o tratamento foi de 15,6 mg/L (PITANGUI, 2012).

Ao final do período de incubação, os biofilmes com e sem tratamento foram raspados com o auxílio de alças microbiológicas descartáveis e, posteriormente, foi adicionado 1 mL de água Milli-Q® estéril em cada poço para a lavagem das células. Toda a suspensão foi colocada em tubos Falcon de 50 mL e centrifugadas até a obtenção de um *pellet*.

3.7.2. Extração total de proteínas

Para a extração das proteínas, o pellet foi ressuspenso em 3 mL de solução de Tris HCl 10mM, pH8.8 e com 1 μ L/mL de um mix de inibidores de proteases PLAC (pepstatina, leupeptina, aprotinina, antipaina, quimiostatina - *Sigma-Aldrich*) e 10 μ L/mL de PMSF (fenilmetilsulfonil fluoreto- *Sigma-Aldrich*). Em seguida foram adicionadas pérolas de vidro estéreis aos tubos Falcon contendo a suspensão de *pellets* e inibidores de proteases.

As amostras foram então submetidas a processos de congelamento em nitrogênio líquido e agitação em vortéx, repetidos três vezes, alternadamente. Para otimizar a extração, as amostras foram mantidas em sonificador por 15 minutos, seguido por centrifugação a 4000 rpm por 60 minutos à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi recolhido e as amostras foram precipitadas (SCORZONI, 2008).

3.7.3. Precipitação das proteínas

Para a precipitação das proteínas, foram pipetados volumes iguais dos sobrenadantes e de solução de TCA 10% e acetona 90% e colocados em microtubos 1.5 mL. Em seguida, a suspensão foi incubada a 4°C *overnight*. Após a incubação, os microtubos foram centrifugados a 14000 rpm, por 15 minutos, à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi então descartado e o *pellet* foi lavado por três vezes com acetona 90%, com centrifugações a 14000rpm, 4°C por 15 minutos a cada lavagem. Ao final das lavagens, o sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram secos à temperatura ambiente. Em seguida, os *pellets* foram ressuspendidos e as proteínas foram dosadas (SCORZONI,2008).

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

A dosagem das proteínas foi realizada pelo método de Bradford. Para cada 1.5 mL do reagente *Coomassie plus™ protein assay* foram adicionados 50 μ L de amostra.

A suspensão foi homogeneizada cuidadosamente e deixada em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente. Após o tempo de reação (10 minutos), foi determinada a absorbância das amostras em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 595 nm. As concentrações das proteínas foram determinadas através da comparação com uma curva-padrão previamente estabelecida. Para análise do proteoma, foram feitos os cálculos para obtenção de 600 µg de proteína (BRADFORD, 1976).

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

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

3.7.6. Reidratação das fitas

As fitas (*IPG-immobilized pH gradient*) foram hidratadas com a adição de 250 µL de solução de reidratação (Ureia 7M, Thiourea 2M, Triton X 100, Azul de bromofenol e água milli Q), 5µL de *IpG buffer* (*GE Healthcare*), com pH específico para a fita utilizada e 3 µL de *DeStreak* (*GE Healthcare*). Por fim, as fitas foram cobertas com *Cover Fluid* por um período de 10 a 20 horas.

3.7.7. Focalização Isoelétrica (IEF) – Primeira Dimensão

Os componentes proteicos foram então submetidos à focalização isoeletrica, utilizando o sistema Ettan IPGphor 3 (*GE Healthcare*), para separação de acordo com o ponto isoeletrico (pI). A aplicação da amostra foi feita utilizando *Cup load*. As fitas (*IPG-immobilized pH gradient*) selecionadas para a caracterização das proteínas presentes na amostra foram de 13 cm, lineares, com gradiente de pH de 4-7. No término da focalização, as mesmas foram colocadas em tubos de vidro estéril e armazenadas a -80°C até o equilíbrio e a segunda dimensão.

3.7.8. Equilíbrio das fitas

Para o equilíbrio das fitas, inicialmente foram adicionados 100 mg de DTT (ditiotretitol; agente redutor; *GE Healthcare*) a 10mL de solução de equilíbrio. A solução foi homogeneizada e adicionada à fita, que foi mantida sob agitação leve por 20 minutos. Decorrido este período, a solução foi descartada. Posteriormente, 250 mg de iodoacetamida (agente alquilante; *GE Healthcare*) foram adicionados a 10 mL de solução de equilíbrio, homogeneizados e adicionados aos tubos com as fitas, sob agitação por 20 minutos. Por fim, a solução foi descartada e as fitas foram aplicadas em géis de poliacrilamida a 12,5%.

3.7.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) - Segunda Dimensão

A cada gel submetido à corrida eletroforética foram colocados 5 μ L do padrão de massa molecular (*GE Healthcare*). Previamente à aplicação no gel, a massa molecular padrão foi aquecida em banho-maria por 5 minutos, conforme recomendação do fabricante.

Após focalização e equilíbrio, as fitas e o padrão foram acomodados apropriadamente sob o gel. Em seguida, foi adicionada solução de agarose a 0,5% levemente aquecida, para fixar as fitas no gel.

A segunda dimensão foi realizada para a separação das proteínas de acordo com a massa molecular. As condições eletroforéticas aplicadas como pH, força iônica e tampão e estavam de acordo com os padrões estabelecidos por (LAEMMLI, 1970).

Na corrida eletroforética foi fixada a corrente de 15 V durante 15 minutos, e 30 V por gel por aproximadamente 240 minutos. Os parâmetros elétricos foram fornecidos por uma fonte de alimentação. A separação eletroforética foi realizada mantendo-se a temperatura entre 6-10 °C para evitar distorções das bandas, e, conseqüentemente, problemas de resolução. Após a eletroforese, os géis foram corados utilizando o *PlusOne Silver Staining kit, Protein* (*GE Healthcare*).

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os ensaios foram realizados pelo menos em triplicata e a análise estatística foi feita através de análise de variância e teste t, com pós-testes de Bonferroni, no software GraphPad Prism 5.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE *H. capsulatum* FRENTE A COMPOSTOS DERIVADOS DE CHALCONA E DO ÁCIDO PROTOCATECUICO PELA TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO

A atividade antifúngica de 92 compostos derivados de chalcona e do ácido protocatecuico frente ao isolado clínico *H. capsulatum* EH 317 foi verificada. Além disso, a susceptibilidade do isolado frente ao fármaco fluconazol foi testada. Como controle de qualidade dos testes, foi utilizada a cepa de *C. krusei* ATCC 6258. Após a incubação, a leitura da concentração inibitória mínima foi feita através da adição de Alamar Blue®. Este reagente tem a resazurina como principal ingrediente e esse composto (azul) é reduzido a resorufina (rosa) na presença de atividade metabólica.

Os derivados de chalcona T50, C3, E2a, F2a, T18a, T46a e o protocatecuato de nonila foram os compostos que melhor inibiram o crescimento do fungo na placa de microdiluição, com valores de CIM correspondentes a 3,95 mg/L (**Tabela 1**). Outros 39 derivados de chalcona, inibiram o crescimento de *H. capsulatum* nas concentrações compreendidas no intervalo de 7.8 a 125 mg/L (**Tabelas 2 e 3**). Os 47 compostos restantes não apresentaram atividade contra o fungo testado, apresentando um valor de CIM > 250 mg/L (**Tabelas 3, 4 e 5**).

Com relação ao fármaco, o isolado clínico de *H. capsulatum* EH 317 mostrou-se resistente ao fluconazol (FCZ), com valor de CIM >125 mg/L. O valor da concentração inibitória mínima para essa droga quando testada frente à cepa referência de *C. krusei* ATCC 6258 corroborou com os dados presentes no documento M27-A3, apresentando um valor de CIM = 128 mg/L, validando assim, a qualidade do teste. (**Tabela 6**).

Tabela 1. Valores de concentração inibitória mínima (CIM), expressos em mg/L para os derivados de chalconas e para o protocatecuato de nonila contra o isolado clínico de *H. capsulatum* EH317.

Composto	T 50	C3	E2a	F2a	T18a	T46a	Nonila (Pt)	T19	T51	B4	T25	T41	B6	T4	T39	B1	T45	T17	T21	T24
CIM (mg/L)	3,95	3,95	3,95	3,95	3,95	3,95	3,95	7,81	7,81	7,81	7,81	7,81	7,81	15,62	15,62	15,62	15,62	31,2	31,2	31,2

Tabela 2. Valores de concentração inibitória mínima (CIM), expressos em mg/L para os derivados de chalconas contra o isolado clínico de *H. capsulatum* EH317.

Composto	T 41a	T42	T51 _a	CH4	D3	J4	A5	A2	T20	T25 _a	T28	T39	T44	D2	T23	T17	A17	G21	D1	D21
CIM (mg/L)	31,2	31,2	31,2	31,2	31,2	31,2	31,2	31,2	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	125	125	62,5

Tabela 3. Valores de concentração inibitória mínima (CIM), expressos em mg/L para os derivados de chalconas contra o isolado clínico de *H. capsulatum* EH317.

	A3	J6	J20	T1	T3	D6	G4	G5	G6	G14	G15	G18	T30	T45	T50	CH3	G19	G20	G23	G24
Composto	125	125	125	125	125	125	>250	>250	>250	>250	>250	>250	> 250	>250	>	>250	>250	>250	>250	>250
CIM (mg/L)	125	125	125	125	125	125	>250	>250	>250	>250	>250	>250	> 250	>250	> 250	>250	>250	>250	>250	>250

Tabela 4. Valores de concentração inibitória mínima (CIM), expressos em mg/L para os derivados de chalconas contra o isolado clínico de *H. capsulatum* EH317.

Composto	G25	D2a	D23	D24	D25	A1	A4	A11	A13	A14	A15	A18	A19	T38	A6	A7	A8-1	A8-2	A10
CIM (mg/L)	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250

Tabela 5. Valores de concentração inibitória mínima (CIM), expressos em mg/L para os derivados de chalconas contra o isolado clínico de *H. capsulatum* EH317.

Composto	A11	A12	D3	D4	D5	D14	D15	D20	G2	G3	T18	E1	T47
CIM (mg/L)	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250

Tabela 6. Valores de concentração inibitória mínima (CIM), expressos em mg/L para fármaco Fluconazol contra o isolado clínico de *H. capsulatum* EH317 e *C. krusei* ATCC 6258.

Fluconazol/ Fungo	<i>H. capsulatum</i> EH317	<i>C. krusei</i> ATCC 6258
CIM (mg/L)	>128	125

4.2. ENSAIO DE FORMAÇÃO DO BIOFILME

4.2.1. Determinação da atividade metabólica do biofilme

A cinética de formação do biofilme do isolado clínico *H. capsulatum* EH317 foi realizada através do ensaio colorimétrico de redução do XTT. Os resultados das atividades metabólicas do biofilme estão dispostos na **Fig. 2**. Pode-se observar que a atividade metabólica inicial ocorreu após as 7 horas de incubação (pré-adesão). No período compreendido entre 7 e 96 horas, houve um aumento significativo dessa atividade. Após as 96 horas ainda houve um ligeiro aumento, porém, a partir de 120 h a atividade metabólica tendeu à queda, sendo assim, 96 horas foi considerado o tempo ideal para a maturação do biofilme do isolado clínico testado.

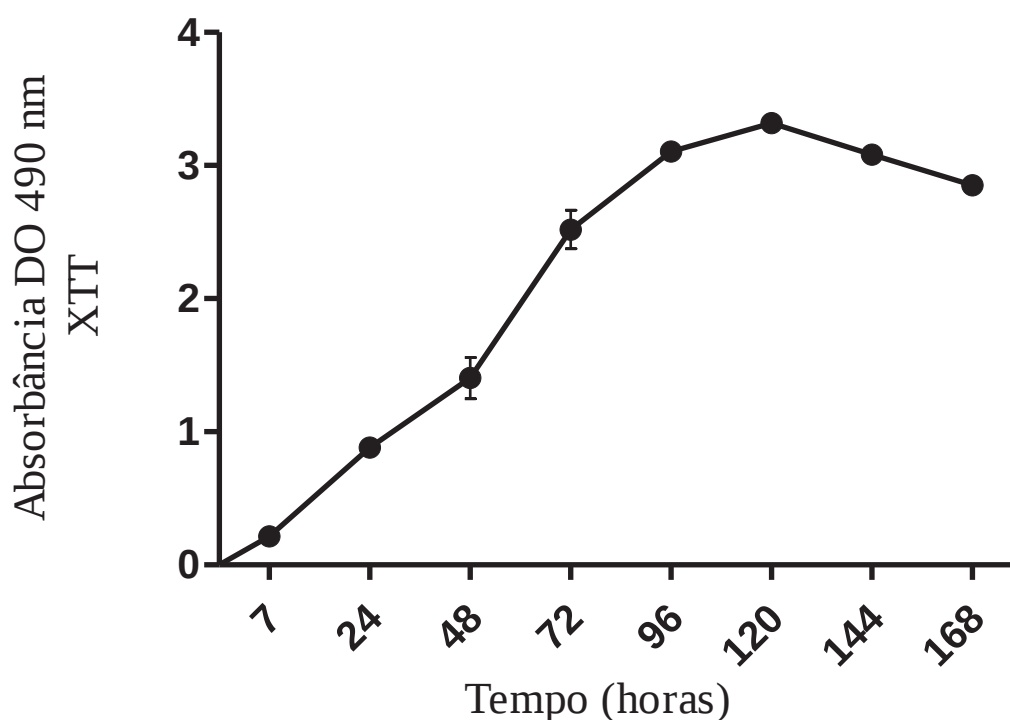


Figura 2. Cinética de formação do biofilme de *H. capsulatum* EH 317 em placa de microdiluição a 37 °C. Cada ponto representa a média de quatro medidas de absorbâncias

4.2.2. Quantificação da matriz extracelular pela coloração com safranina

A quantificação da matriz extracelular e do material polissacarídico foi feita pela coloração com safranina em diferentes tempos de formação do biofilme. Os resultados mostraram que os valores das absorbâncias e, por conseguinte a produção de material polissacarídico, cresceu com o decorrer do tempo e indicaram um valor máximo em 96 horas. A **Fig. 3** mostra que em 96 horas de formação do biofilme, há uma produção significativa de material polissacarídico quando comparado aos tempos de 24, 48 e 72 horas ($p < 0,001$).

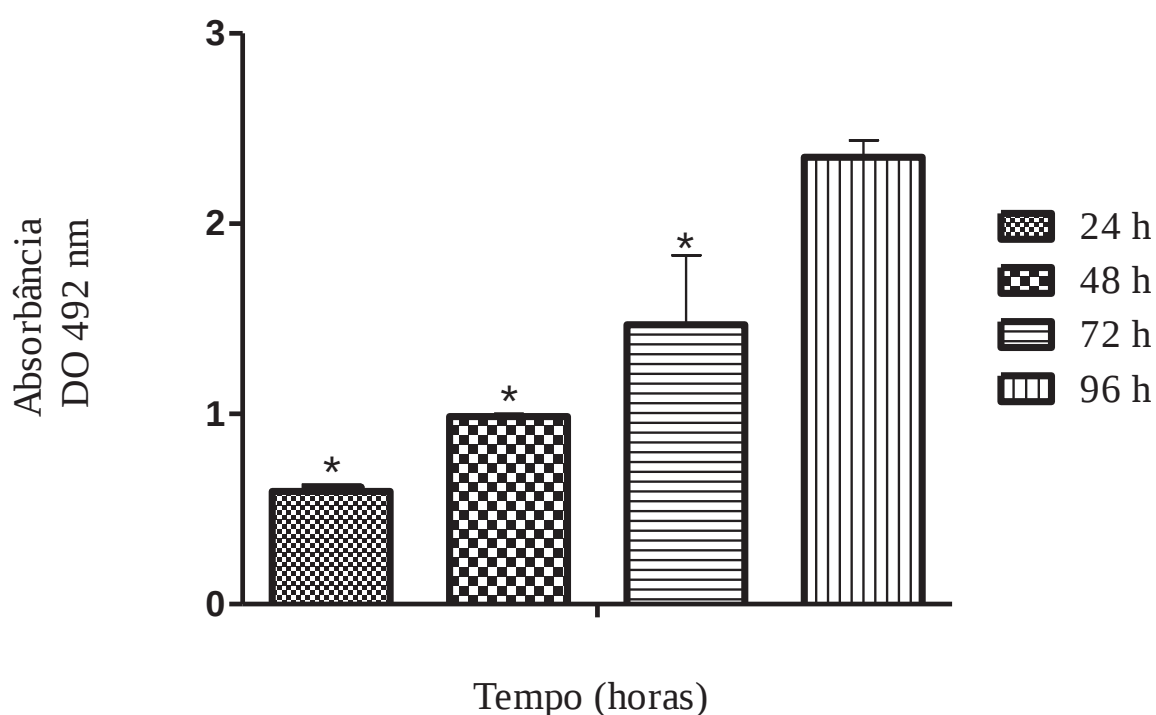


Figura 3. Quantificação da matriz extracelular no decorrer da formação do biofilme de *H. capsulatum* EH 317. Houve um aumento significativo da matriz após 96 h de crescimento quando comparado aos demais tempos. * $p < 0,001$.

4.2.3. Quantificação da biomassa pela coloração com Cristal Violeta

A massa do biofilme produzida em função do tempo foi quantificada pela coloração com cristal violeta. Os resultados dispostos na **Fig. 4** mostraram que os valores das absorbâncias cresceram com o decorrer do tempo e indicaram um valor máximo após 96 horas da formação do biofilme. Observa-se ainda um aumento significativo da biomassa após 96 horas quando comparado aos tempos de 24, 48 e 72 horas ($p < 0,001$).

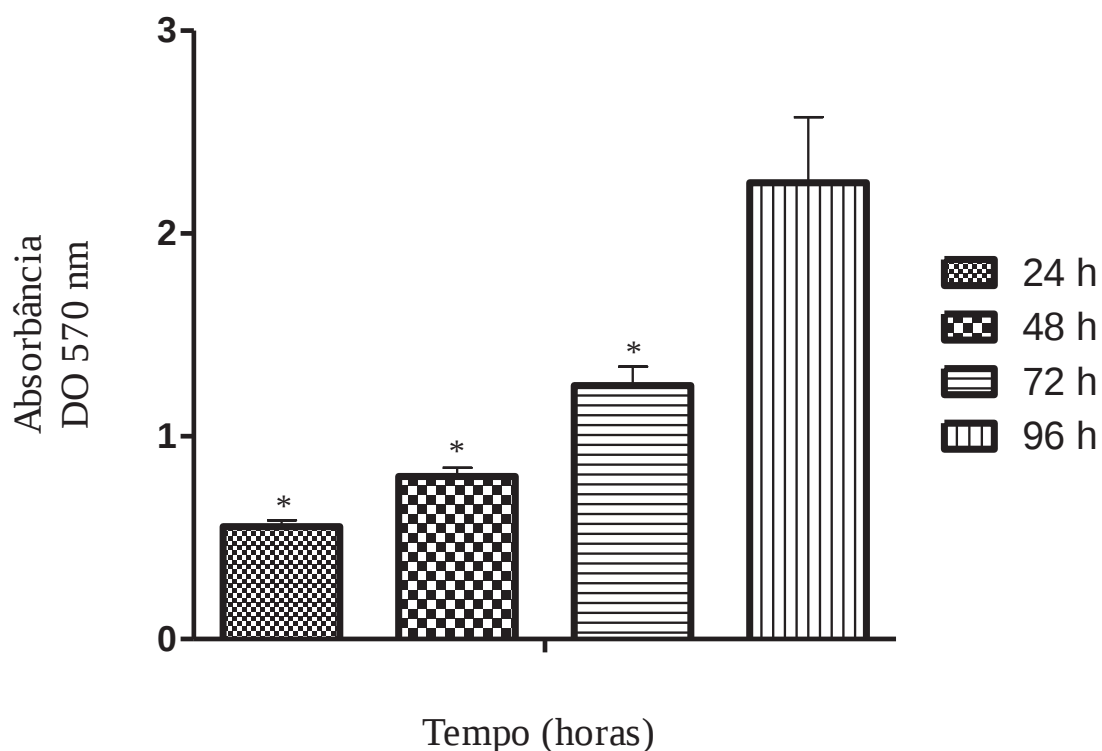


Figura 4. Quantificação da biomassa em função do tempo *H. capsulatum* (isolado EH 317) através da coloração com cristal violeta. Apresentou aumento significativo da biomassa após 96 h de crescimento quando comparado aos demais. $*p < 0,001$.

4.2.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O desenvolvimento do biofilme de *H. capsulatum* EH 317 foi verificado através de microscopia eletrônica de varredura após 24, 48, 72 e 96 horas (**Fig.5**). Após 96 horas observa-se uma biomassa mais compacta, correspondente ao biofilme maduro.

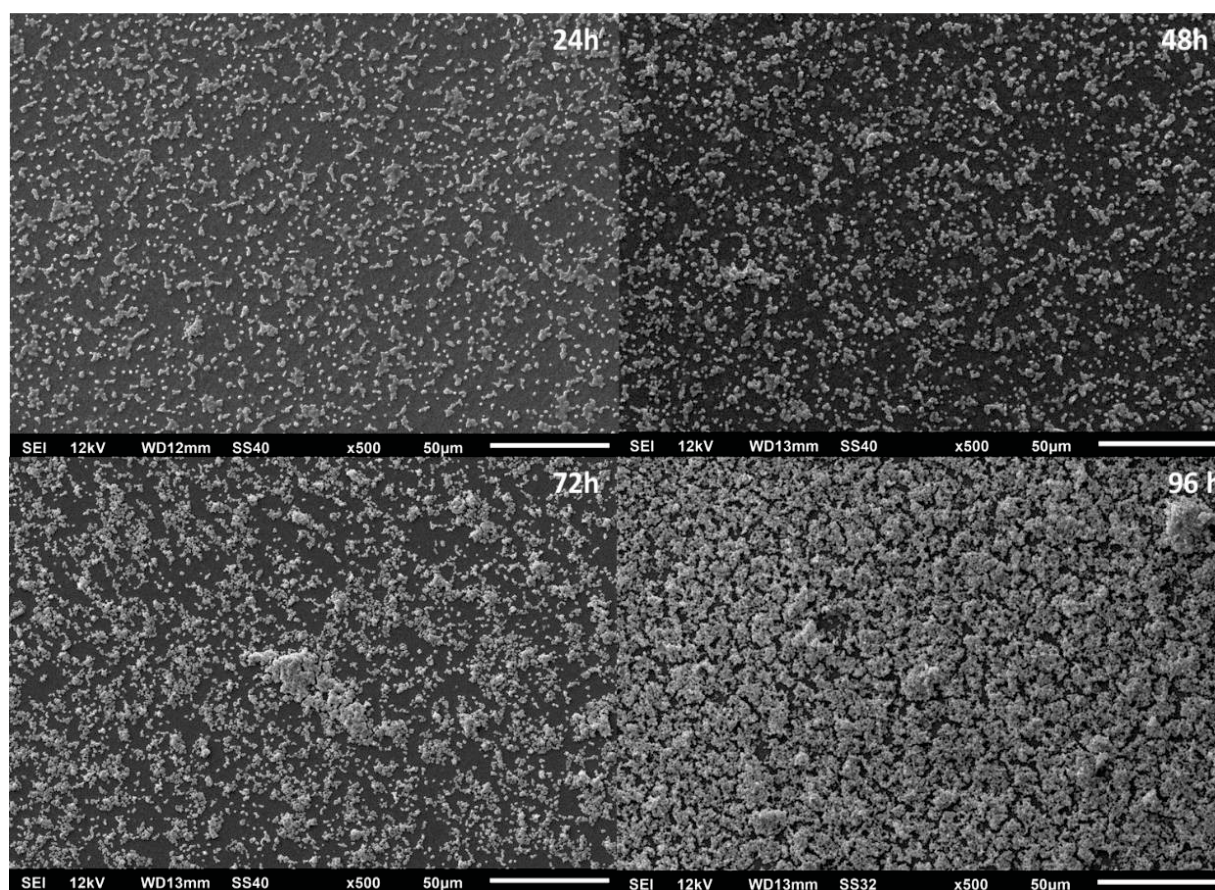


Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura da formação do biofilme de *H. capsulatum* EH 317 após 24h, 48h, 72h e 96h de incubação a 37°C.

A **Fig. 6** mostra a microscopia eletrônica de varredura do biofilme após 96 horas, em diferentes magnificações. É possível observar um aglomerado celular denso, no qual as leveduras encontram-se envoltas por uma matriz extracelular polimérica, representada pelas setas vermelhas.

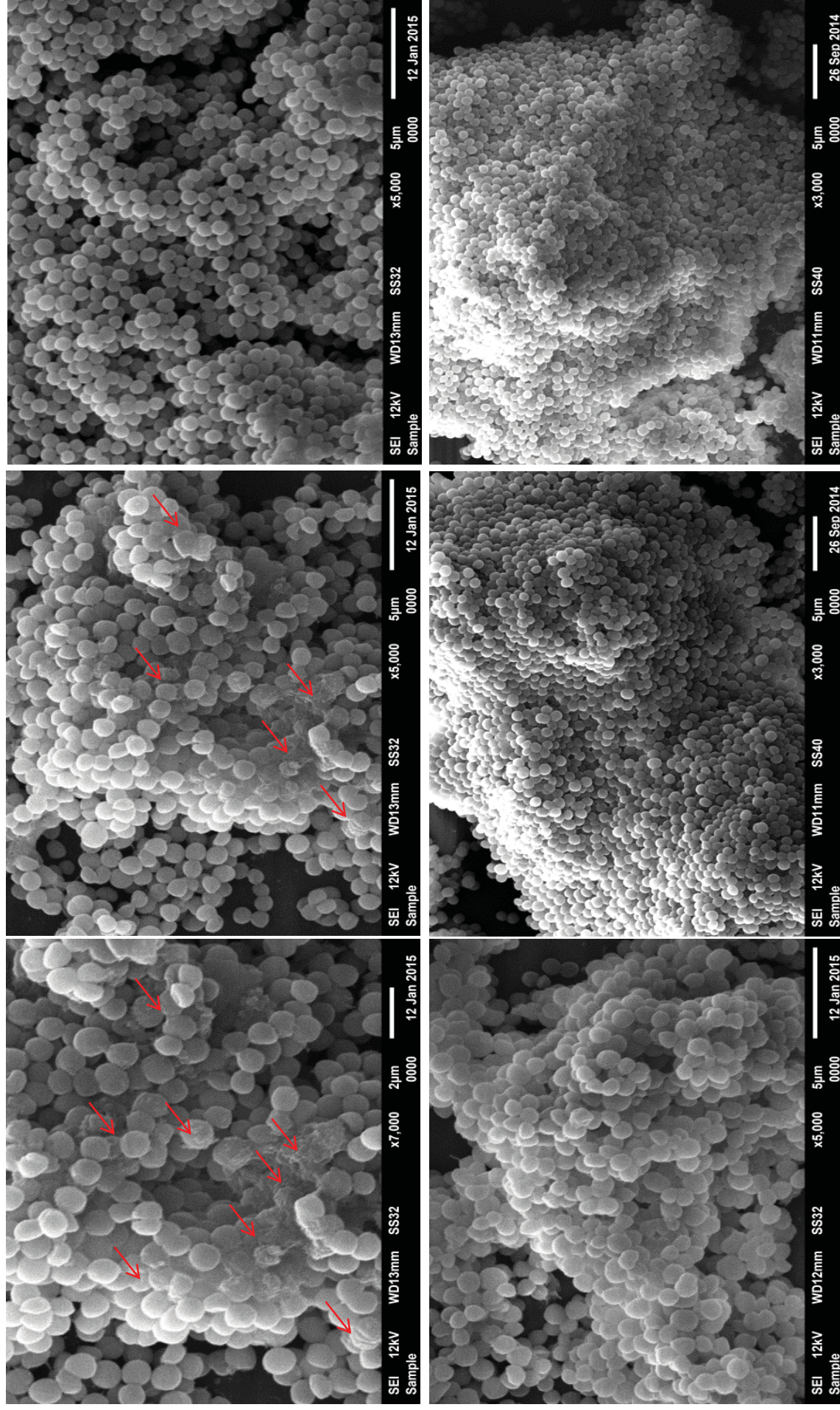


Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura em diferentes magnificações do biofilme de *H. capsulatum* EH 317 após 96 h de crescimento. As setas apontam para a presença de matriz extracelular interligando as leveduras.

4.2.5. Microscopia Confocal de Varredura a Laser

O biofilme maduro de *H. capsulatum* EH 317 também foi observado em microscópio confocal, em triplicata. Imagens ortogonais em 3D do biofilme foram obtidas a fim de melhor visualizar a sua espessura e arquitetura. Os resultados mostraram que os biofilmes maduros deste isolado formados em caldo BHI apresentaram espessuras correspondentes a 24,17; 23 e 25 μm .

Na **Fig. 7**, a coloração vermelha é emitida por FUN 1, que cora os agregados densos no citoplasma de células metabolicamente ativas (**Fig. 7B**), enquanto que a intensa coloração verde resulta da ligação da Concanavalina A (ConA) à glicose e à manose da parede celular fúngica (**Fig. 7A**). A **Fig. 7C** mostra a sobreposição dos dois corantes e a **7D** indica o corte ortogonal do biofilme em 3D, com espessura de 25 μm .

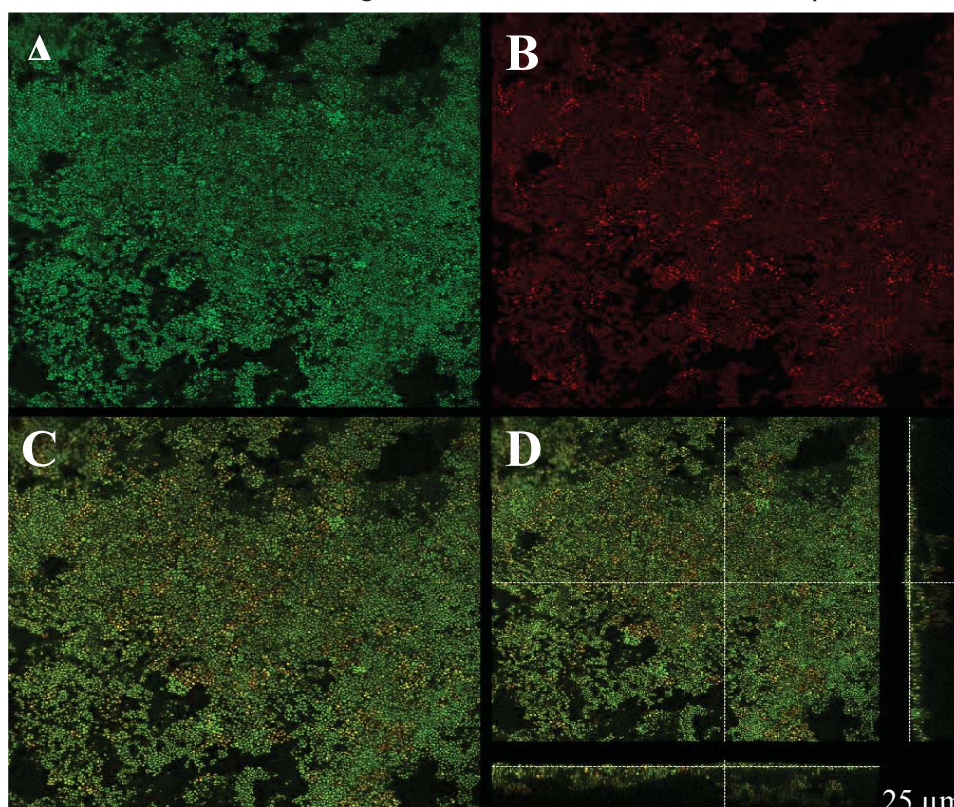


Figura 7. Microscopia confocal do biofilme após 96h de crescimento do isolado clínico *H. capsulatum* EH-317. A Concanavalina A cora a parede celular e a matriz extracelular em verde (A), enquanto FUN 1 cora as células viáveis em vermelho (B). C representa a sobreposição dos dois corantes, enquanto D mostra o corte ortogonal em 3D indicando uma espessura de 25 μm .

4.2.6. Avaliação da susceptibilidade da forma de crescimento planctônico frente ao protocatecuato de nonila

O protocatecuato de nonila foi um dos compostos testados que apresentaram melhor atividade anti-*Histoplasma*, com valor de CIM = 3,9 mg/L (Tabela 1). Sendo assim, a capacidade desse composto de prevenir a formação do biofilme foi verificada. O inóculo foi preparado na concentração de 5×10^6 cels/mL e co-incubado com as soluções-trabalho de nonila, no intervalo de concentração de 250 a 0,97 mg/L, à temperatura de 37°C, por 96 horas. Terminado o período de incubação, as atividades metabólicas das células planctônicas foram quantificadas pelo ensaio de redução do XTT. Para esse protocatecuato, foi considerada como atividade, a concentração que proporcionou a redução de 90% da atividade metabólica quando comparado ao controle sem tratamento. Essa redução deve-se ao fato da nonila ser considerado um composto fungicida contra *T. rubrum* (SOARES, 2014) e outros fungos dermatófitos, *Cryptococcus* sp e *H. capsulatum* (dados não publicados).

Os resultados dispostos da **Fig. 8** mostram que as concentrações do protocatecuato de nonila iguais ou superiores a 3,9 m/L tiveram atividade contra as células planctônicas testadas, na concentração de 5×10^6 cels/mL.

4.2.7. Avaliação da susceptibilidade do biofilme maduro frente ao protocatecuato de nonila

Para a avaliação da susceptibilidade do biofilme maduro frente ao protocatecuato de nonila, foi seguido o protocolo descrito por Pierce e colaboradores (2008). Foi considerada atividade anti-biofilme as concentrações testadas que reduziram 90% da atividade metabólica. A **Fig. 9** mostra que a nonila teve atividade sobre o biofilme maduro e que a concentração que causou redução de 90% da atividade metabólica foi a de 125 mg/L.

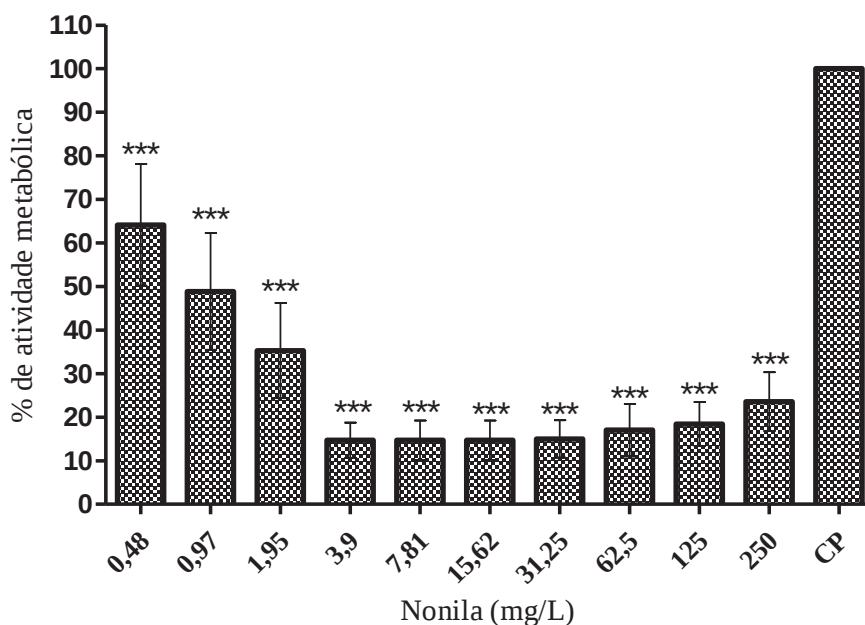


Figura 8. Efeito do protocatecuato de nonila frente às células planctônicas de *H. capsulatum* EH 317. Os asteriscos indicam redução significativa da atividade metabólica quando comparado ao controle livre de droga (** $p < 0,001$).

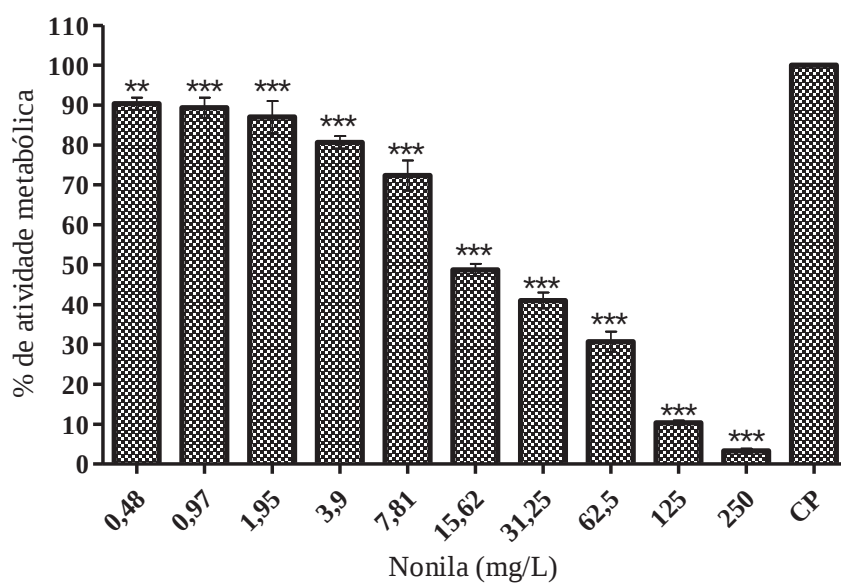


Figura 9. Efeito do protocatecuato de nonila frente ao biofilme maduro de *H. capsulatum* EH 317. Os asteriscos mostram redução significativa da atividade metabólica quando comparado ao controle livre de droga (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.2.8. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do biofilme tratado

Para melhor visualização dos danos causados pelo composto ao biofilme de *H. capsulatum* EH 317, foi realizada a MEV. O biofilme foi formado após 96 h de incubação e colocado em contato por outras 96 h com o protocatecuato de nonila em duas concentrações sub-ótimas: 62,5 mg/L e 31,25 µg/mL. A concentração de 125 mg/L foi testada, porém não foi possível observar células viáveis. Uma explicação possível para esse fato é que a pouca quantidade de células que restaram após o tratamento pode ter sido descolada do fundo da placa na lavagem anterior à colocação da solução fixadora de glutaraldeído, ou pode ter sido lavada com os banhos sucessivos de álcool.

Na **Fig. 10** é possível observar os biofilmes sem tratamento (**Fig.10A**) e tratados com 31,25 mg/L (**Fig.10B**) e 62,5 mg/L (**Fig.10C**) do protocatecuato de nonila. Ainda na **Fig.10B**, observa-se que com o tratamento há uma redução da biomassa, porém ainda é possível observar aglomerado de células, matriz extracelular e algumas células danificadas. Já na **Fig.10C**, observa-se uma redução drástica dos aglomerados celulares, com pouca presença de material polissacarídico e poucas células ainda viáveis e sem danos.

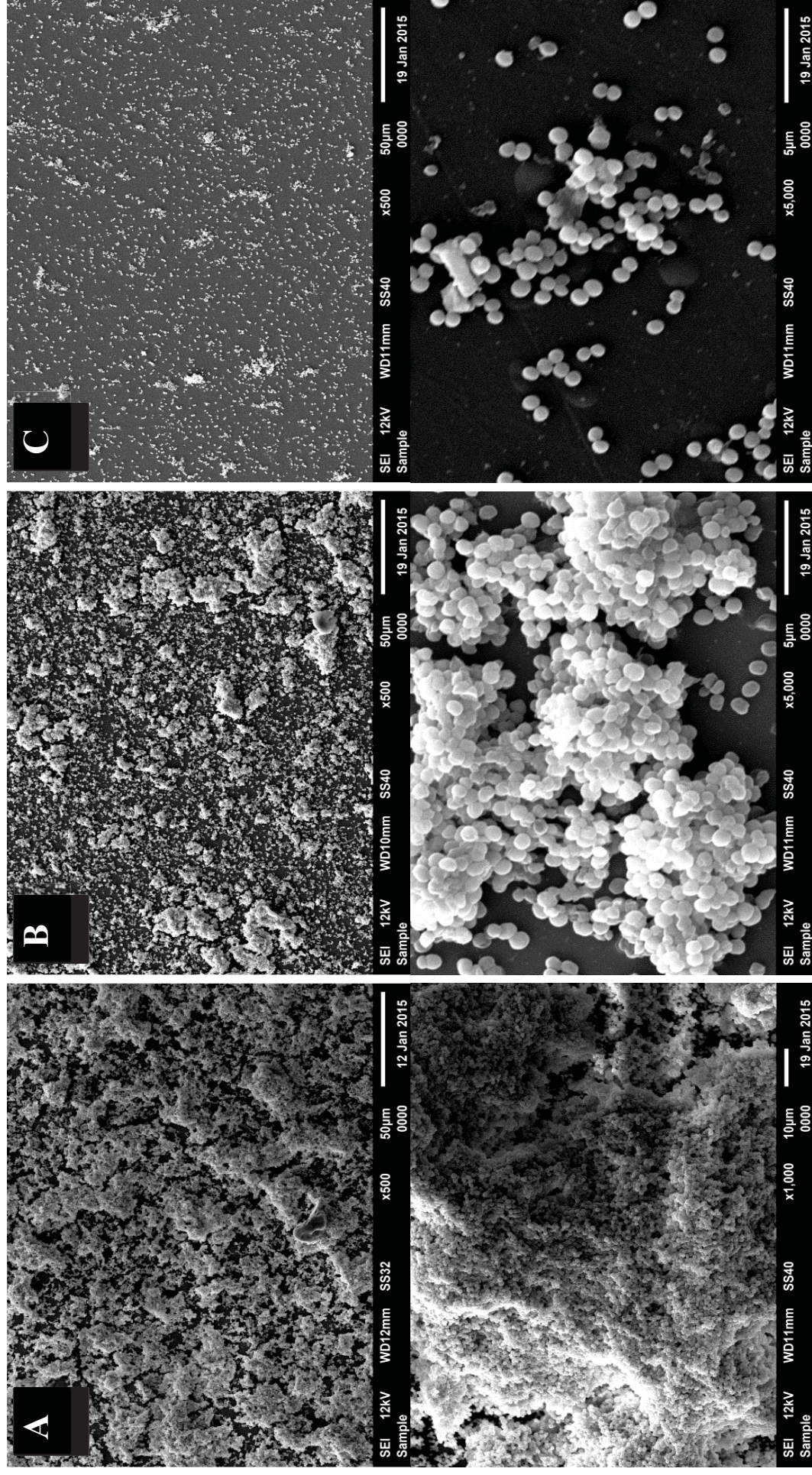


Figura 10. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro de *H. capsulatum* EH317 com e sem tratamento com o protocatecuato de nonila. A) mostra o biofilme não tratado; B) indica os biofilmes tratados com nonila na concentração de 31,25 mg/L, enquanto C mostra o biofilme tratado com 62,5 mg/L de nonila.

4.2.9. Microscopia Confocal de Varredura a Laser do biofilme tratado

A microscopia confocal do biofilme tratado com a nonila na concentração de 62,5 mg/L foi realizada a fim de verificar a influência do composto na espessura e arquitetura dos biofilmes.

A **Fig.11** mostra cortes ortogonais em 3D do controle sem tratamento (**Fig.11A**) e de duas replicatas do biofilme tratado (**Fig.11B e 11C**). Nos biofilmes tratados, as espessuras foram medidas baseadas nos aglomerados celulares restantes, porém, observa-se que na maior parte do campo há pouquíssimas células viáveis, sugerindo que, no todo, a espessura seja bem menor. Se considerarmos apenas os aglomerados, as espessuras das 3 replicatas testadas foram de 17,12; 14,1 e 17,1 μm .

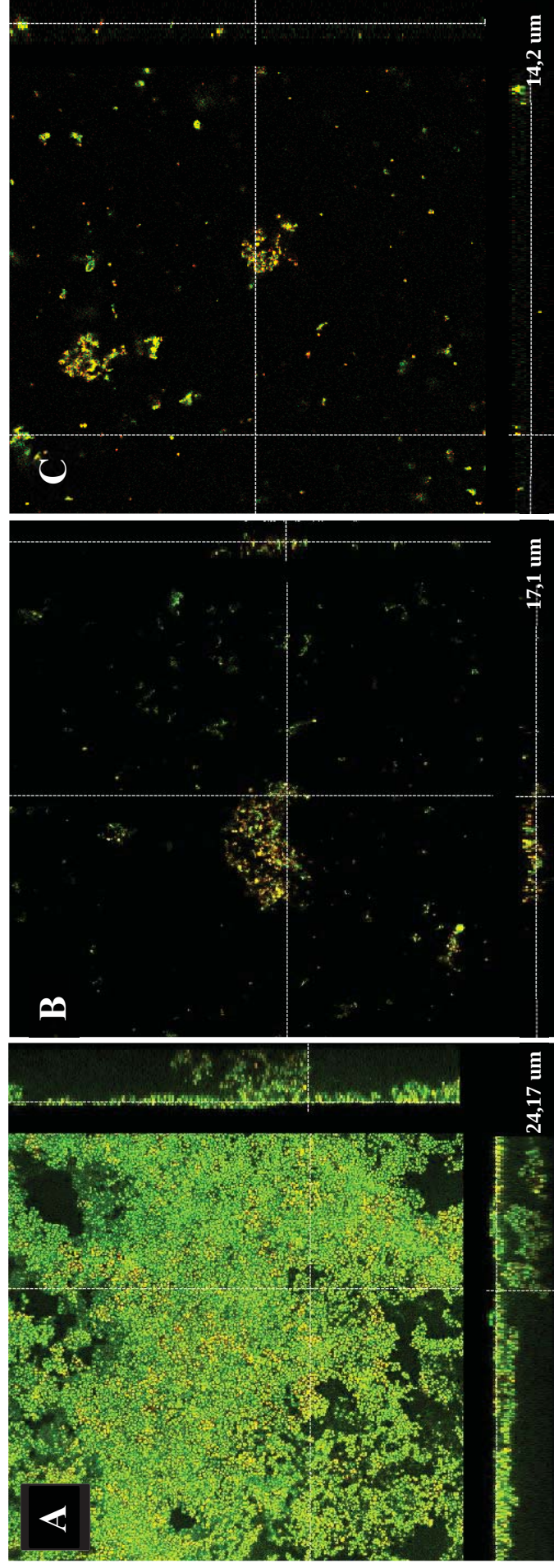


Figura 11. Microscopia confocal de varredura a laser do biofilme de *H. capsulatum* EH317 com e sem tratamento com o protocatuato de nonila na concentração de 62,5 mg/L. A = controle sem tratamento com espessura de 24,17 µm; B = biofilme tratado, com espessura de 17,1 µm; C = biofilme tratado, com espessura de 14,2 µm.

4.2.10. Quantificação da biomassa após o tratamento através da coloração por cristal violeta

Os resultados da quantificação da biomassa do biofilme tratado pela coloração com cristal violeta estão dispostos na **Fig.12**. Houve uma diminuição significativa da absorbância do biofilme tratado com 62,5 mg/L de nonila quando comparada ao biofilme sem tratamento ($p<0,05$).

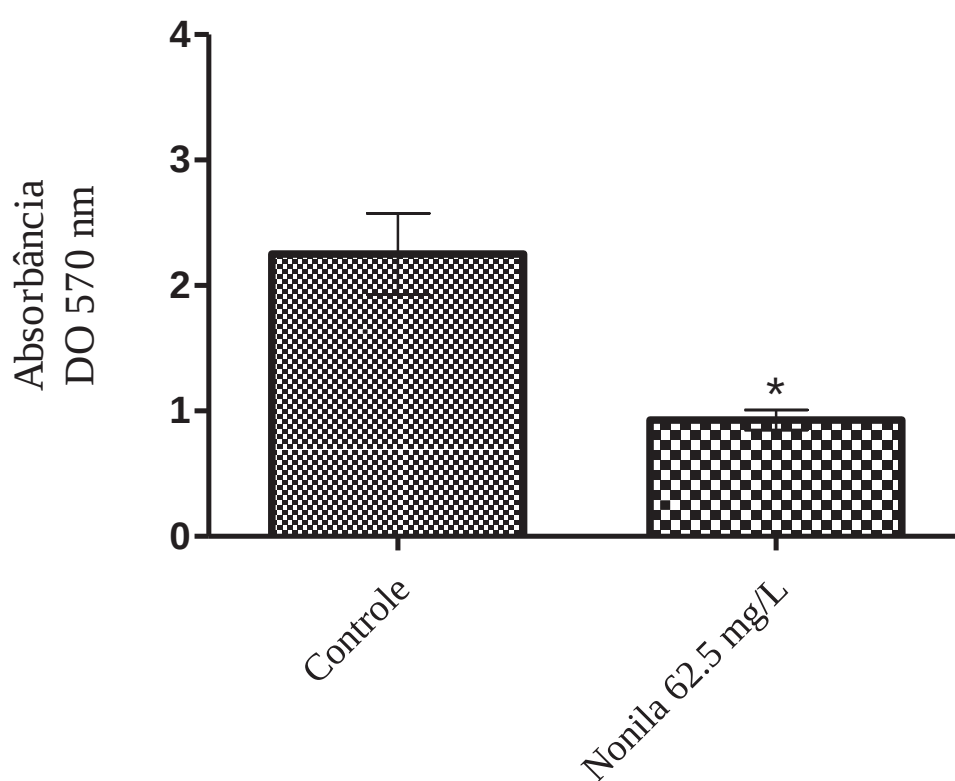


Figura 12. Quantificação da biomassa após o tratamento com nonila através da coloração por cristal violeta. Houve uma diminuição significativa da absorbância do biofilme tratado com 62,5 mg/L de nonila quando comparada ao biofilme sem tratamento (* $p<0,05$).

4.2.11. Quantificação da matriz extracelular do biofilme pós-tratamento através da coloração com safranina

Assim como nos resultados anteriores, após o tratamento houve diminuição significativa da matriz extracelular no biofilme de *H. capsulatum* EH317, quando comparado ao biofilme sem tratamento ($p < 0,05$) (**Fig.13**).

As reduções da biomassa e da matriz extracelular condizem com os resultados apresentados no MEV e na microscopia confocal do biofilme tratado, visto que, apesar da existência dessas estruturas elas foram significativamente diminuídas.

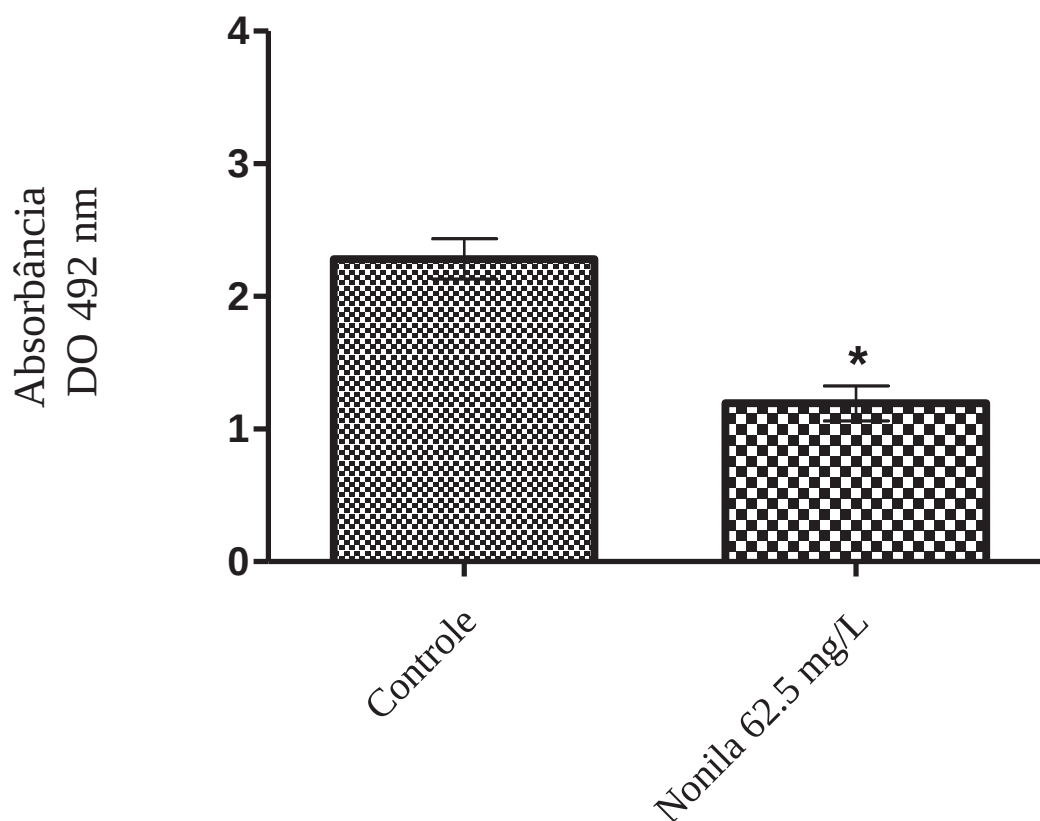


Figura 13. Quantificação da matriz extracelular pela coloração com a safranina após tratamento com o protocatuato nonila na concentração de 62,5 mg/L (* $p < 0,05$).

4.3. ANÁLISE PROTEÔMICA

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

Os componentes totais do isolado clínico *H. capsulatum* EH317 em formato biofilme com e sem tratamento foram analisados por SDS-PAGE. O perfil eletroforético demonstrou diferenças significativas quanto à intensidade das bandas. Na **Fig.14**, foi possível observar o desaparecimento de 6 bandas no biofilme tratado, quando comparado ao biofilme sem tratamento (apontadas pelas setas em vermelho) e o aumento da intensidade de outras 4 bandas (apontadas pelas setas em preto) no biofilme sem tratamento, quando comparado ao biofilme tratado. Além disso, nota-se também o aparecimento de uma banda (apontada pela seta em verde) exclusiva do biofilme tratado.

As seis primeiras setas compreendem proteínas com massas moleculares entre 97 e 66 KDa. Já para as demais bandas, as proteínas encaixam-se nas massas correspondentes à faixa entre 30 a 14 KDa.

A diferença na expressão proteica do biofilme sem tratamento em comparação ao biofilme tratado pode nos levar a um provável mecanismo de ação do composto testado e um possível alvo antifúngico. Para essa confirmação, é preciso que seja realizado o sequenciamento das proteínas para a identificação e posterior análise da função das mesmas.

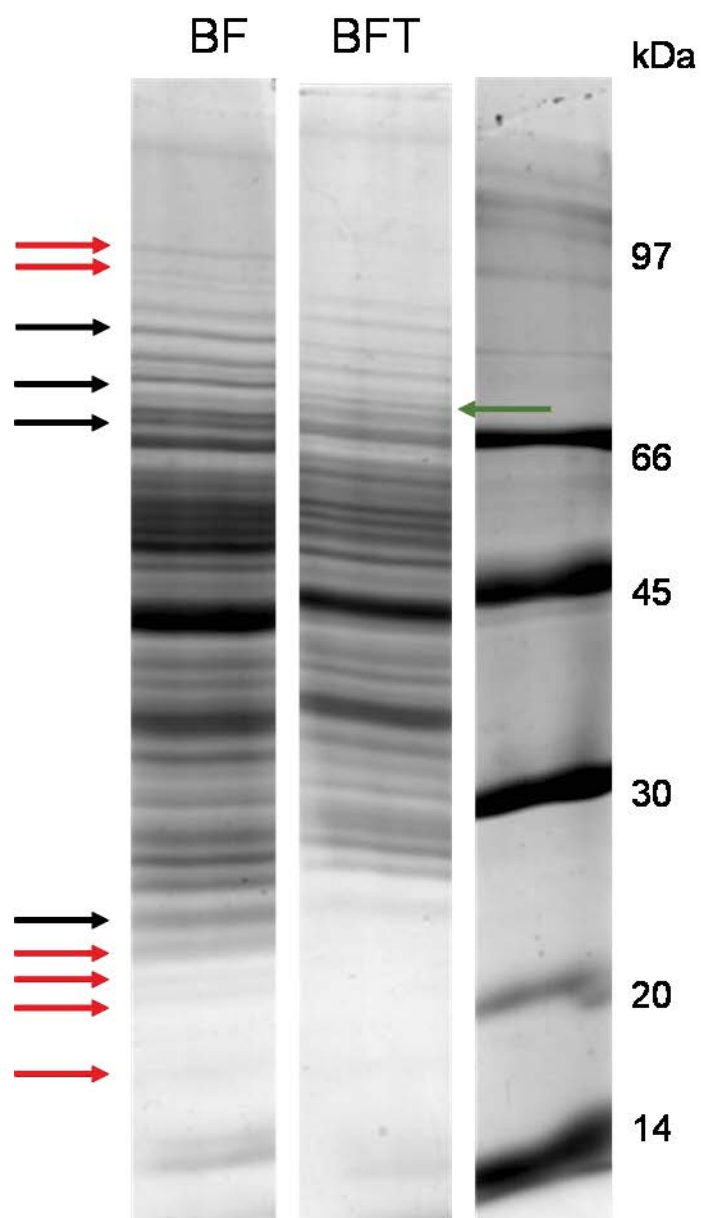


Figura 14. SDS-PAGE dos componentes proteicos do biofilme de *H. capsulatum* EH317 sem tratamento (BF) e com tratamento com 15,6 mg/L de nonila (BFT).

4.3.2 Perfis proteico por Eletroforese bidimensional

Para a análise do perfil proteico, os biofilmes foram inicialmente tratados com diferentes concentrações do protocatuato de nonila (62,5; 31,25 e 15,6 mg/L). Porém, a extração de proteínas só foi satisfatória quando os biofilmes foram tratados com a concentração de 15,6 mg/L do composto. A análise do perfil de proteínas do biofilme do isolado clínico EH 317 mostrou a presença de 131 proteínas distribuídas entre os pesos moleculares de 68 e 8 kDa e ponto isoelétrico de 4,0 e 6,9 como demonstrado na **Fig.15**. As regiões consideradas mais importantes por apresentarem maior número de proteínas foram selecionadas na **Fig.15** e ampliadas nas **Figs. 16 e 17**.

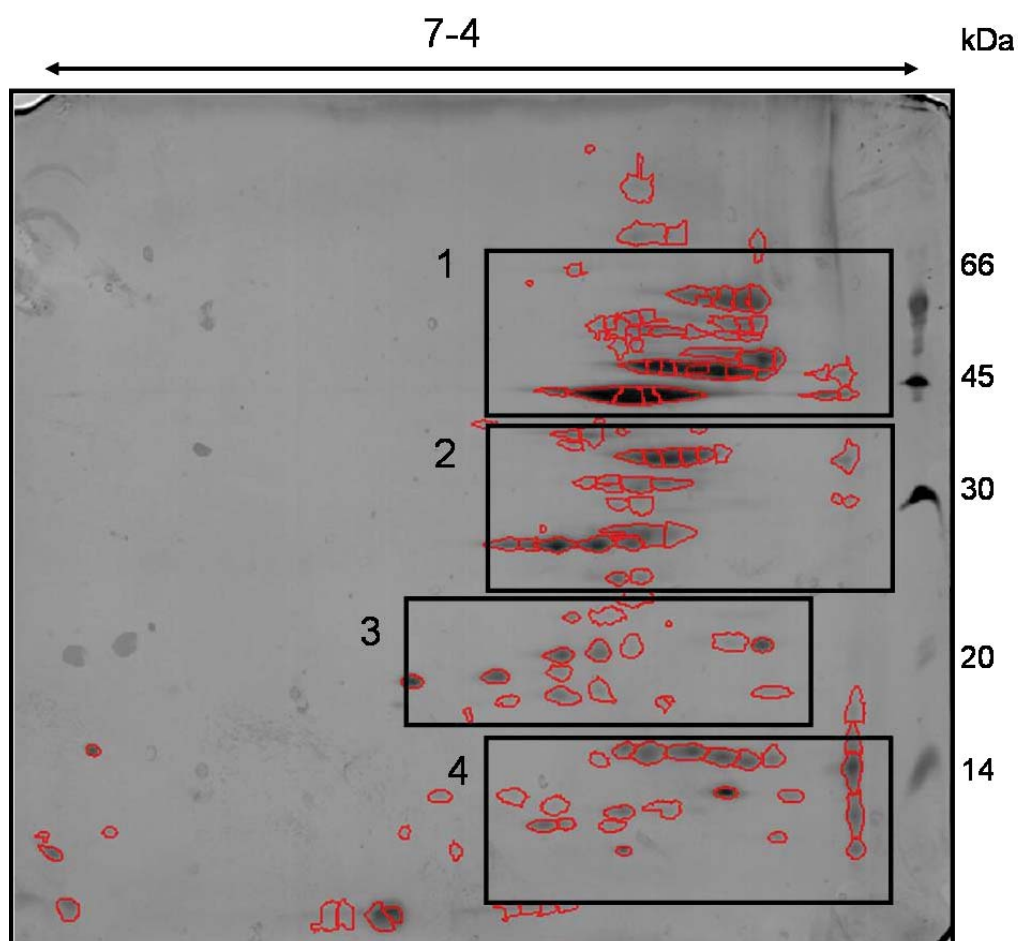


Figura 15. Perfil protéico dos componentes do biofilme do isolado clínico de *H. capsulatum* EH317 analisado por eletroforese bidimensional usando fita de pH 4-7 e gel de SDS-PAGE de concentração de 12,5%.

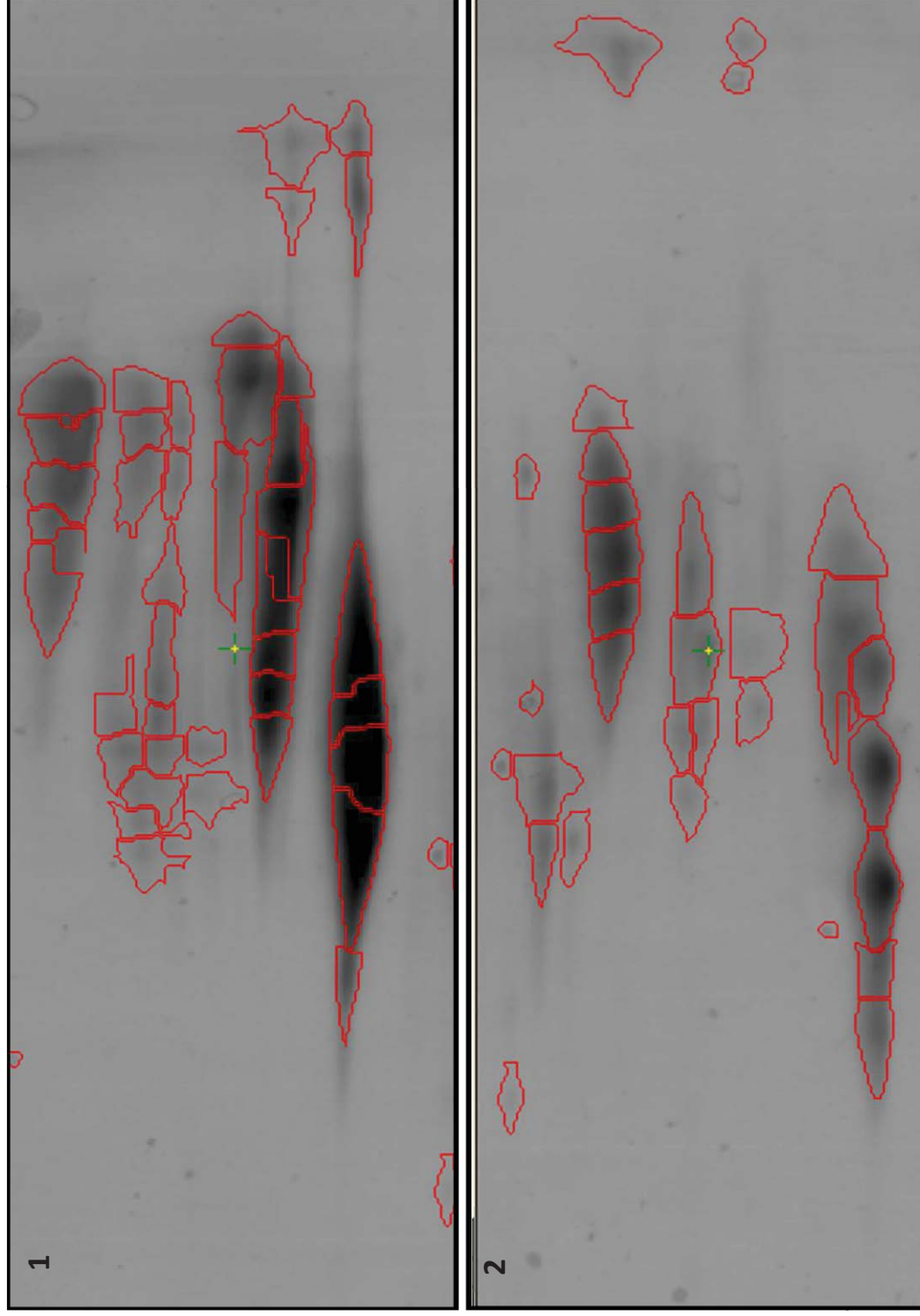


Figura 16. Visão ampliada das regiões indicadas na eletroforese bidimensional representada na figura 15. (1) Região de separação proteica com massa molecular entre 66 e 45 kDa e ponto isoeletrico de 5.34. (2) Região de separação proteica com massa molecular entre 45 e 30 kDa e ponto isoeletrico de 5.34.

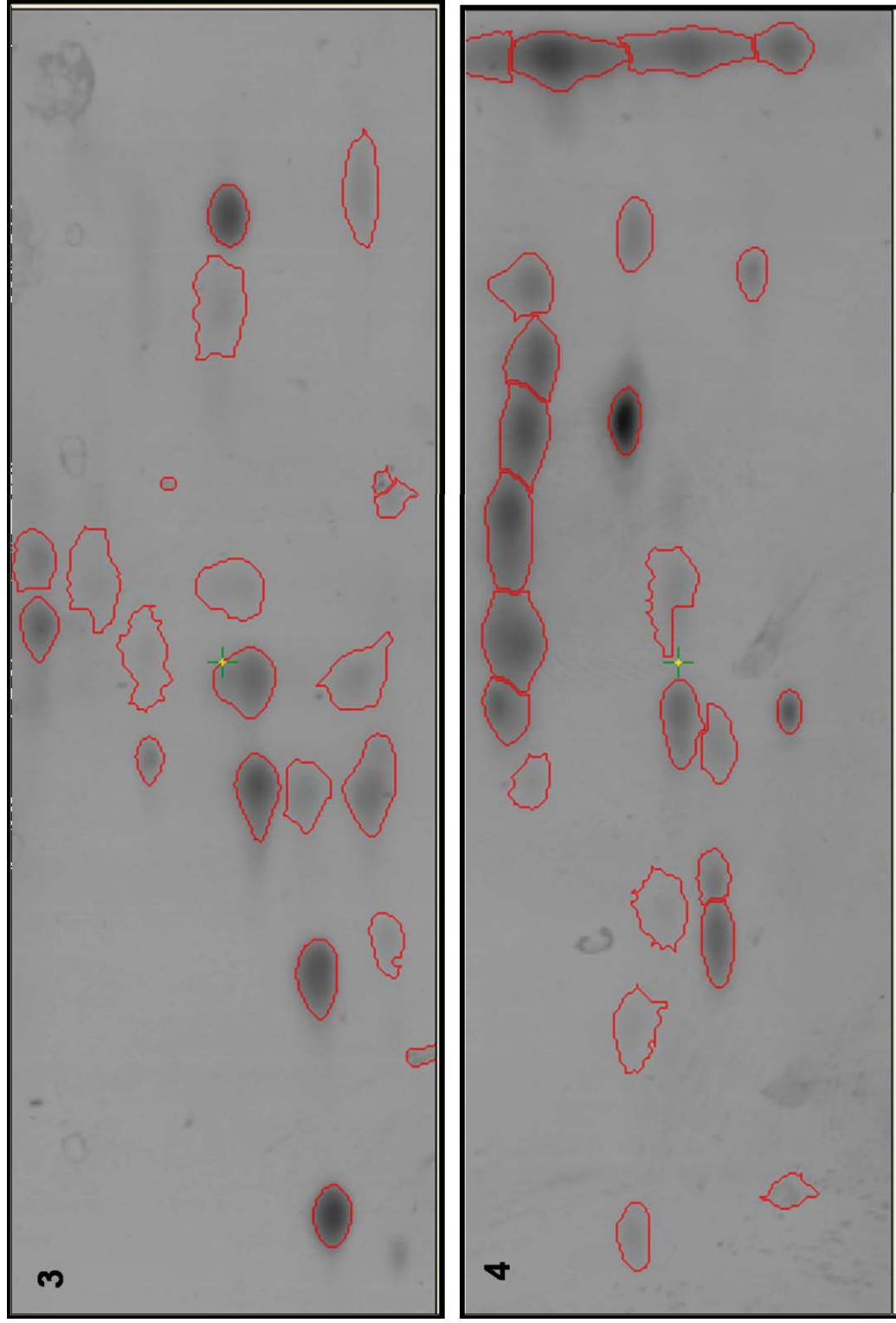


Figura 17. Visão ampliada das regiões indicadas na eletroforese bidimensional. (3) Região de separação proteica com massa molecular entre 30 e 20 kDa e ponto isoeletrico de 5.62. (4) Região de separação proteica com massa molecular entre 20 e 14 kDa e ponto isoeletrico de 5.13.

Nesse estudo foi proposta a realização da eletroforese bidimensional do biofilme tratado para o melhor entendimento da ação do protocatecuato nonila, bem como para a busca de novos alvos contra essa forma de crescimento. Entretanto, devido ao baixo rendimento na obtenção de amostras durante a extração de proteínas e a grande quantidade de matriz extracelular, que é composta por grande quantidade de carboidratos, houve dificuldade na visualização de proteínas, interferindo na interpretação da eletroforese bidimensional, portanto, a seleção das proteínas diferencialmente expressas foi realizada pela eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

Discussão

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi utilizado o isolado clínico EH317 de *H. capsulatum*, proveniente de paciente com SIDA da cidade de Morelos, no México. Esse isolado fez parte de um estudo realizado por Kasuga e colaboradores (2003), no qual foram analisadas as relações filogenéticas entre 137 isolados clínicos, ambientais e cepas ATCC, que representavam três variedades (*H. capsulatum* var. *capsulatum*, *H. capsulatum* var. *duboisii* e *H. capsulatum* var. *farciminosum*) de 6 continentes. A análise foi realizada utilizando a sequência de DNA de quatro genes codificadores de proteínas independentes (fator de ribosilação do ADP (arf); antígeno H precursor (anti-H); ole e α -tubulina (tub 1). Dois isolados provenientes do México, entre eles o EH317, apresentaram distinção nos genes anti-H e tub 1 quando relacionados aos demais isolados do mesmo clado. Entretanto, como eles dividem alelos com os demais isolados desse clado (como ole e arf), ambos não podem ser considerados espécies filogenéticas independentes, porém, encontram-se no clado que representa as espécies mais filogeneticamente diversas.

A terapêutica da histoplasmose varia de acordo com a síndrome clínica e o estado imunológico do hospedeiro (FERREIRA E BORGES, 2009). A anfotericina B é um fármaco de amplo espectro com ação fungicida, muito utilizado no tratamento de micoses sistêmicas. Ela age no ergosterol presente na membrana da célula fúngica, através da ligação do anel macrolídico aos esteróis da membrana, promovendo uma alteração na permeabilidade seletiva, permitindo assim, a saída de nutrientes fundamentais para a célula e causando uma consequente deterioração metabólica e morte celular (SOKOL-ANDERSON et al, 1986). Uma desvantagem da utilização desse fármaco é explicada pelo fato de que esse polieno também se liga ao colesterol da membrana plasmática humana, causando diminuição do fluxo glomerular e consequente nefrotoxicidade (WHITE et al, 1998; BARQUIST et al, 1999; CATALÁN & MONTEJO, 2006; SMITH & KAUFFMAN, 2012).

Outro grupo de fármacos muito utilizados no tratamento das micoses são os azólicos, como o itraconazol e fluconazol. Esses fármacos possuem ação

fungistática de amplo espectro e inibem a enzima lanosterol 14- α demetilase no complexo citocromo P-450 da célula fúngica, inibindo a síntese do ergosterol e aumentando a permeabilidade da membrana celular. Além disso, esse aumento da permeabilidade causa perda de elementos essenciais como aminoácidos e potássio e dificulta a utilização de moléculas precursoras do DNA, como purinas e pirimidinas. O uso abusivo de derivados azólicos tem acarretado o surgimento de isolados multirresistentes (GRAIBILL et al, 1998 CAZEDEY et al ,2007, PITANGUI, 2012).

O itraconazol é um fármaco efetivo para a histoplasmose, porém não é muito bem tolerado por todos os pacientes. O fluconazol é menos ativo que o itraconazol e a anfotericina B, devido ao desenvolvimento de mecanismos resistência pela célula fúngica. Nesse trabalho, a atividade do fluconazol foi testada contra o isolado EH317 nas concentrações compreendidas entre 125 a 0,48 mg/L e o valor de CIM foi superior a 125, indicando resistência ao fluconazol. Essa resistência tem sido reportada na literatura, que sugere que o tratamento prolongado com a utilização desse azólico aumenta os valores de concentração inibitória mínima para isolados clínicos em até 4 vezes (WHEAT et al, 1997; ANDREU et al, 2003; WHEAT et al, 2006). Além disso, um estudo realizado por Wheat e colaboradores (2006) relatou que a exposição ao fluconazol está associada à redução da susceptibilidade a outros fármacos, como o voriconazol.

Os mecanismos de resistência de *H. capsulatum* ao fluconazol ainda não estão bem esclarecidos, porém não há relatos de resistência intrínseca, o que significa que ela é adquirida durante o tratamento e pode ser resultado da diminuição da sensibilidade da síntese de ergosterol (WHEAT, 1996).

A pesquisa e o desenvolvimento de novos antifúngicos são um desafio, porque, com exceção da parede celular e da presença de ergosterol em lugar do colesterol como lipídio de membrana, as células dos fungos são metabolicamente semelhantes às células dos mamíferos. Como consequência, há pouca disponibilidade de alvos específicos aos fungos. Além disso, o desenvolvimento clínico é dificultado pelo diagnóstico tardio, principalmente nas

doenças sistêmicas causadas por fungos menos comuns ou mais resistentes. Sendo assim, a busca de novos compostos com potencial atividade antifúngica é uma necessidade urgente (ZACCHINO et al, 2003; OSTROSKY-ZEICHNER, 2010).

Para ser um candidato ideal a novo antifúngico, os compostos devem apresentar algumas propriedades, entre elas a seletividade para o alvo, ser atóxico para o hospedeiro; ter meia vida longa no plasma, além de baixa ligação às proteínas plasmáticas; ausência de interferência com outros fármacos, entre outras características (MIMS et al., 1999; LACAZ et al., 2002; ZACCHINO et al., 2003). Devido a isso, os produtos naturais são excelentes candidatos a agentes antifúngicos pelo seu amplo espectro de atividades biológicas. Nos países desenvolvidos, 30% dos medicamentos produzidos são provenientes de recursos naturais (SIXEL & PECINALLI, 2002; NEWMANN, CRAGG & SNADER, 2003).

Nosso grupo tem utilizado diversos compostos sintéticos e semissintéticos de origem vegetal e os tem testado contra diversas espécies de fungos patogênicos. Os derivados sintéticos do ácido protocatecuico foram testados contra fungos *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* (SOARES et al, 2014), *C. neoformans*; *Candida* spp e *Paracoccidioides brasiliensis* (dados não publicados). Entre os diversos derivados, os que mais se destacaram com relação à atividade antifúngica foram os protocatecuato de nonila e decila, contendo 9 e 10 carbonos na cadeia alquílica lateral. Devido aos excelentes resultados com outras espécies fúngicas, nesse trabalho foi verificada a eficácia do protocatecuato de nonila contra *H. capsulatum*. Os valores de CIM corresponderam a 3,9 mg/L. Além do protocatecuato de nonila, também foram testados 92 derivados de chalconas e as que tiveram melhor atividade foram as chalconas T50, C3, E2a, F2a, T18a, T46a, com valores de CIM também correspondentes a 3,9 mg/L.

Cerca de 80% das infecções fúngicas humanas estão relacionadas à formação de biofilmes, que constituem um problema clínico crescente, e está associada a altas taxas de mortalidade (WILLIAMS & COSTERTON, 2012). As

células em formato biofilme conseguem sobreviver com maior facilidade aos ambientes hostis. A formação dessas comunidades é descrita para diversos microrganismos, como bactérias e fungos. Entre os últimos, *Candida spp*, *C. neoformans*, *P. brasiliensis*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Aspergillus sp*, *H. capsulatum*, entre outros, foram descritos como capazes de formar biofilmes (MARTINEZ & CASADEVALL, 2006; DONLAN & COSTERTON, 2012; PITANGUI, 2012; COSTA-ORLANDI, 2014; KAUR, 2014; SARDI 2015).

No presente trabalho, verificou-se a capacidade de formação do biofilme pelo isolado clínico de *H. capsulatum* EH 317. Para avaliar a atividade metabólica do biofilme durante sua formação, foi utilizado o ensaio de redução do XTT (ZHOU et al, 2012), no qual o sal de tetrazólio (coloração amarela) é convertido ao sal de formazana (coloração avermelhada), na presença de atividade metabólica. O biofilme dessa cepa apresentou uma atividade metabólica inicial após as 7 horas de incubação (pré-adesão), semelhante ao biofilme de *H. capsulatum* isolado EH315, descrito por Pitangui e colaboradores (2012). Entretanto, a maturação do biofilme para o isolado EH315 ocorreu no tempo de 72 h enquanto que, no isolado clínico testado neste trabalho (EH317), a maturação ocorreu no tempo de 96 h.

A técnica de microscopia confocal de varredura a laser tem superado as deficiências do microscópio óptico convencional, principalmente devido à capacidade de seccionamento das amostras. Em seguida, as secções são analisadas através do auxílio de um software, que permite que as imagens sejam colocadas em 3D. Devido a isso, no caso dos biofilmes, é possível que se meça a espessura. Para a realização dessa microscopia, é necessário que a amostra esteja fluorescente. Neste trabalho, foram utilizados os fluorocromos FUN-1 [2-cloro-4-4(2,3-(dihidro-3-metil) benzo-1,3-tiazol2 metilideno) -1-fenilquinolinio iodeto] e a Concanavalina A (ConA). O FUN 1 penetra nas células por difusão passiva e, nas células metabolicamente ativas, é concentrado nos vacúolos, gerando estruturas intra vacuolares, que são convertidas em uma sonda fluorescente vermelha. Já a ConA se liga à glicose e manose da parede celular, emitindo uma fluorescência verde (MILLARD et al, 1997; CHANDRA et al, 2001; PAMP, STERNBERG & TOLKER-NIELSEN, 2009; PITANGUI et al, 2012). As

secções obtidas na microscopia confocal de *H. capsulatum* EH317, nos permitiram concluir que os biofilmes desse isolado tiveram, em média, 24 µm de espessura. Ao compararmos com o biofilme do isolado ambiental de *H. capsulatum* EH315 (9,41 µm), observou-se que os biofilmes de EH317 foram mais espessos que o isolado ambiental, caracterizado por Pitangui (2012).

A técnica de coloração com safranina tem sido empregada por diversos autores para quantificação das substâncias exopoliméricas dos biofilmes fúngicos e bacterianos (CHRISTENSEN et al., 1982; FESSIA & GRIFFIN, 1991; LEMBKE et al., 2006; SEIDLER et al, 2006; SEIDLER et al, 2008; STANDAR et al., 2010; COSTA-ORLANDI et al., 2014). Nesse estudo foi possível observar que após 96 horas de formação do biofilme, há uma produção significativa de material polissacarídico quando comparado aos tempos de 24, 48 e 72 horas de formação do biofilme.

Adicionalmente, a coloração com cristal violeta também têm sido amplamente utilizada para a quantificação da massa do biofilme (MARTINEZ & CASADEVALL, 2006; COSTA-ORLANDI et al., 2014; ESPINA et al., 2015). O Cristal violeta se liga a moléculas de superfície negativamente carregadas e em polissacarídeos constituintes da matriz exopolimérica dos biofilmes (HESS et al., 2015). O isolado clínico EH317, durante o tempo de formação do biofilme, apresentou valores crescentes das absorbâncias com o decorrer do tempo e a absorbância teve um valor máximo em 96 horas de maturação. Os resultados da quantificação da biomassa corroboram com as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura, que mostram o aumento do desenvolvimento da biomassa em função do tempo.

O protocatecuato de nonila foi um dos compostos testados que apresentaram melhor atividade contra o isolado EH317. Sendo assim, a sua capacidade de prevenir a formação do biofilme foi verificada. As concentrações de nonila iguais ou superiores a 3,9 mg/L foram capazes de inibir a formação do biofilme. Nonila também foi testada quanto à capacidade de danificar o biofilme maduro. Para essa avaliação, foi utilizado o protocolo descrito por Pierce e colaboradores (2008). Foi considerada atividade anti-biofilme as concentrações

testadas que reduziram 90% da atividade metabólica. Os resultados indicaram que, a partir da concentração de 125 mg/L, a redução da atividade metabólica do biofilme foi de 90% quando comparada ao controle sem tratamento. Estudos recentes desenvolvidos por Brilhante e colaboradores (2015) nos biofilmes de *H. capsulatum* relataram redução considerável das atividades metabólicas quando tratados com farnesol. Além disso, demonstraram que os fármacos anfotericina B e itraconazol reduzem a atividade metabólica dos biofilmes, em média, em 14% quando testados em concentrações equivalentes a 15 x MIC. Nós observamos que o Protocatecuato de nonila em 15 x MIC, foi capaz de reduzir, aproximadamente, em 58% a atividade metabólica dos biofilmes.

Neste estudo também exploramos a quantificação da biomassa dos biofilmes tratados através da técnica de coloração por cristal violeta, bem como a quantificação da matriz extracelular através da técnica de coloração com safranina. Os resultados das absorvâncias revelaram que o protocatecuato de nonila promoveu uma redução de 61% da biomassa e 48% na produção de matriz extracelular dos biofilmes de *H. capsulatum*. Os dados obtidos após coloração por safranina e cristal violeta confirmam as imagens de MEV e microscopia confocal de varredura, nas quais é possível observar um dano drástico na arquitetura tridimensional dos biofilmes, visto a espessura reduzida dos mesmos quando submetidos ao tratamento.

Na descoberta de novos compostos com propriedade antifúngica em potencial, ensaios de citotoxicidade se fazem necessários. Neste sentido, Soares e colaboradores (2014), ao testaram diversas concentrações de nonila em queratinócitos normais de mucosa oral (NHOK). Os resultados obtidos mostraram que, nas concentrações superiores a 15,6 mg/L, esse composto foi tóxico para as células tratadas. Mais testes precisam ser realizados, afim de confirmar a toxicidade desse composto.

Para um melhor entendimento da ação do protocatecuato de nonila na inibição da formação do biofilme, foram realizadas análises das proteínas do biofilme com e sem tratamento. Com essa análise foi possível observar que o tratamento com o protocatecuato de nonila diminuiu a expressão de proteínas

de diferentes pesos moleculares, cuja identificação pode gerar dados importantes quanto ao seu mecanismo de ação. A utilização da análise proteômica tem como objetivo elucidar o mecanismo de ação de compostos com atividade antifúngica e é descrita em diferentes estudos. O perfil de proteínas de *A. fumigatus* tratado com cumarina (substância ativa contra este fungo) resultou no aparecimento de 143 proteínas diferencialmente expressas. Entre essas, encontram-se proteínas relacionadas com a divisão celular, estresse, replicação e processos de biossíntese (SINGH et al, 2012).

O farnesol é uma molécula do quorum-sensing produzida por *C. albicans*, que possui ação sobre a transição levedura - hifa e a formação de biofilmes. Com o conhecimento dessa ação do farnesol, foi realizada a análise proteômica de *A. nidulans* exposto a essa substância. Os resultados mostram alteração no perfil de proteínas de *A. nidulans*, sendo elas envolvidas no metabolismo de aminoácidos, respiração, glicólise, morfologia, entre outros. Além disso, nesse mesmo estudo, foi elucidada a função de uma proteína ainda não caracterizada (proteína semelhante a desidrina), que teve sua expressão induzida pela presença de farnesol. Os mutantes da proteína semelhante a desidrina são mais susceptíveis ao estresse de temperatura, o que sugere que esta tenha papel na proteção dos conídios à temperatura (WARTENBERG et al, 2012). A argenilactona é um produto natural com atividade antifúngica contra *Paracoccidioides* spp. e não apresenta citotoxicidade ou genotoxicidade. O perfil proteômico de *P. lutzii* após a incubação com argenilactona aponta que o fungo sofre adaptação metabólica, sendo reprimidas vias como a glicólise, o ciclo de Krebs e o ciclo do glioxilato e ativando o ciclo do metilcitrato e beta-oxidação. Esses resultados ajudaram no entendimento da ação de argenilactona em *P. lutzii* (PRADO et al, 2015).

Soares (2011) realizou a análise proteômica comparando o tratamento de células planctônicas de *T. rubrum* com terbinafina e o protocatecuato de nonila, com células planctônicas de *T. rubrum* sem tratamento. A análise das proteínas do tratamento com a terbinafina revelou na modificação da expressão de 26 proteínas, nas quais a maioria teve a diminuição de sua expressão. Já para o

tratamento com o protocatecuato de nonila, a análise revelou a modificação da expressão de 8 proteínas.

Neste trabalho, a análise proteômica foi realizada, porém ainda necessita de estruturação. Com os resultados obtidos no SDS-PAGE, foi possível observar a inibição de proteínas no biofilme submetido ao tratamento com nonila; o surgimento de uma banda exclusiva no biofilme tratado; bem como a diminuição da intensidade de algumas proteínas no biofilme tratado, quando comparadas ao biofilme não tratado. Sendo assim, podemos afirmar que a análise proteômica é uma ferramenta importante para o entendimento do mecanismo de ação de compostos em biofilmes, além da determinação de novos alvos terapêuticos.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Com a análise dos resultados obtidos nesse trabalho concluiu-se que:

- Os derivados de chalconas e o protocatecuato de nonila foram capazes de inibir o crescimento do isolado clínico de *H. capsulatum* EH317;
- Os melhores valores de concentração inibitória mínima foram obtidos por seis derivados de chalconas (T50, C3, E2A, F2A, T18A e T46A) e pelo protocatecuato de nonila, com valores de CIM = 3,9 mg/L;
- *H. capsulatum* EH317 mostrou-se resistente ao Fluconazol;
- O isolado clínico *H. capsulatum* EH317 foi capaz de formar biofilme *in vitro* após 96 horas, em caldo BHI suplementado;
- Em 96 horas, o biofilme formado por esse isolado atingiu um valor máximo de atividade metabólica e produziu mais biomassa e matriz extracelular, quando comparado aos demais tempos;
- A espessura média dos biofilmes maduros foi de 22 µm;
- O protocatecuato de nonila foi capaz de inibir a formação do biofilme nas concentrações iguais ou superiores a 3,9 mg/L, enquanto que, no biofilme maduro, causou redução de 90% da atividade metabólica nas concentrações iguais ou superiores a 125 mg/L;
- Após o tratamento com nonila foi comprovada a redução da espessura, biomassa e material polissacarídico dos biofilmes;
- Na análise do perfil proteico foi observada a expressão de proteínas de pesos moleculares diferentes no biofilme não tratado, quando comparado ao biofilme tratado.

Bibliografia

7. BIBLIOGRAFIA

AIDÉ, M. A. Chapter 4--histoplasmosis. **J Bras Pneumol**, v. 35, n. 11, p. 1145-51, Nov 2009. ISSN 1806-3756

AJELLO, L. Italian contributions to the history of general and medical mycology. **Med Mycol**, v. 36 Suppl 1, p. 1-11, 1998. ISSN 1369-3786.

BARQUIST, E.; FEIN, E.; SHADICK, D.; JOHNSON, J.; CLARK, J.; SHATZ, D.A. Randomized prospective trial of amphotericin B lipid emulsion versus dextrose colloidal solution in critically ill patients. **J. Trauma.**, v. 47, p. 336-340, 1999.

BATOVSKA, D.; PARUSHEV, S.P., SLAVOVA, A.; BANKOVA, V.; TSVETKOVA, I.; NONOVA, M.; NAJDENSKI, H.; "Study on the substituent's effects of series of synthetic chalcones against the yeast *Candida albicans*"; **E. J. of Medicinal Chemistry** 42, 87-92, 2007.

BIASOLI, M. S.; TOSELLO, M. E.; MAGARO, H. M. Adherence of *Candida* strains isolated from gastrointestinal tract. **Mycoses**, v. 45, p. 465-69, 1999.

BLACKSTOCK, W.P.; WEIR, M.P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. **Trends in Biotechnology**, v.17 (3), p.121-127, 1999.

BOHSE, M.L.; WOODS, J.P. RNA Interference-Mediated silencing of the *YPS3* Gene of *Histoplasma capsulatum* reveals virulence defects. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 6, p. 2811-2817, 2007.

BRADFORD, M.; M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Bioch.** v.72, p. 248-254, 1976.

BRANDÃO GC, KROON EG, DUARTE MG, BRAGA FC, DE SOUZA FILHO JD, DE OLIVEIRA AB. Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of extracts and

constituents from *Polygonum spectabile* Mart. **Phytomedicine**. 2010 Oct;17(12):926-9.

BRILHANTE, RS., FECHINE, M.A., MESQUITA, J.R.L., CORDEIRO, R.D., ROCHA, M.F., MONTEIRO, A.J., DE LIMA, R.A., CAETANO, E.P., PEREIRA, J.F., CASTELO-BRANCO, D.S.C.M., DE CAMARGO, Z.P., SIDRIM, J.J. (2012). Histoplasmosis in HIV- positive patients in Ceará, Brazil: clinical-laboratory aspects and in vitro antifungal susceptibility of *Histoplasma capsulatum* isolates. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg** 106, 484-488

BULLOCK WE, WRIGHT SD. Role of the adherence-promoting receptors, CR3, LFA-1, BYRD TF, HORWITZ MA. Interferon gamma-activated human monocytes downregulate

CAPPELLI, G. et al. Biofilms invade nephrology: effects in hemodialysis. **Blood Purif**, v. 18, n. 3, p. 224-30, 2000.

CHANDRA, J. et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **J Bacteriol**, v. 183, n. 18, p. 5385-94, Sep 2001.

CLANCY, C.J.; NGUYEN, M.H. Comparison of a photometric method with standardized methods of antifungal susceptibility testing of yeasts. **J Clin Microbiol**; v.35, p.2878-82, 1997.

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

COSTERTON, J. W. et al. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annu Rev Microbiol**, v. 41, p. 435-64, 1987.

COSTERTON, J. W. et al. Microbial biofilms. **Annu Rev Microbiol**, v. 49, p. 711-45, 1995.

COSTERTON, J. W. Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. **Trends Microbiol**, v. 9, n. 2, p. 50-2, Feb 2001.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 49, p. 711-745. 1995.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-22, May 1999.

DARLING, S. T. A protozoan general infection producing pseudotuberculosis in the lungs and focal necrosis in the liver, spleen and lymphnodes. **J.A.M.A.**, **V.46**, n.1, p.1283-1285, 1906.

DARLING, S. T. The morphology of the parasite (*Histoplasma capsulatum*) and the lesions of histoplasmosis, a fatal disease of tropical America. **J.E.M.**, v. 11, n. 4, p. 515-531, 1909.

DAVIES, D., Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nat Rev Drug Discov** 2(2): p. 114-22, 2003.

DEEPE, G. S. J. *Histoplasma capsulatum*. In: *IN: MANDELL, G. L.; BENNET, J. E., et al. (Ed.). Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia: Churchill Livingstone* p.3305-3318, 2009.

DEEPE, G. S. J. *Histoplasma capsulatum*. In: *IN: MANDELL, G. L.; BENNET, J. E., et al. (Ed.). Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia: Churchill Livingstone*, 2009. p.3305-3318.

DEEPE, G. S.; BUESING, W. R. Deciphering the pathways of death of *Histoplasma capsulatum*-infected macrophages: implications for the immunopathogenesis of early infection. **J Immunol**, v. 188, n. 1, p. 334-44, Jan 2012.

DeMONBREUM, W. A. The Cultivation and cultural characteristics of Darling's *Histoplasma capsulatum*. **AM. J. Trop.Med.Hyg.**, v. 14, n. 2, p.93-125, 1934.

DONLAN RM, COSTERTON JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin Microbiol Rev.** Apr;15(2):167-93, 2002.

DOS SANTOS, V.A.; DOS SANTOS, D. P.; CASTRO-GAMBOA, I.; ZANONE, M.V.; FURLAN, M. Evaluation of antioxidant capacity and synergistic associations of quinonemethide triterpenes and phenolic substances from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Molecules.** v. 15, n. 10, p. 6956-6973, 2010.

DUTT, M.J.; LEE, K. H. Proteomic analysis. **Current Opinion in Biotechnology**, v.11, p. 176-179, 2000.

ESTRELA, A.B., M.G. HECK, AND W.R. ABRAHAM, Novel approaches to control biofilm infections. **Curr Med Chem** 16(12): p. 1512-30, 2009.

FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S. Histoplasmosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.**, v. 42, n 2, p. 192-198. mar/abr. 2009.

FERREIRA, M.S.; BORGES, A. Histoplasmosis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 42, p. 192-198, 2009.

FLEMMING, H.C., T.R. NEU, AND D.J. WOZNIK, The EPS matrix: the "house of biofilm cells". **J Bacteriol**, 2007. 189(22): p. 7945-7.

FROST, D.J.; BRANDT, K.D.; CUGIER, D.; GOLDMAN, R. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. **The Journal of Antibiotics**, v. 3, p. 306-310, 1995.

GAUTHIER, G.; KLEIN, B. S. Insights into Fungal Morphogenesis and Immune Evasion: Fungal conidia, when situated in mammalian lungs, may switch from mold to pathogenic yeasts or spore-forming spherules. **Microbe Wash DC.**, Washington DC, v. 3, n. 9, - p. 416–423, set. 2008.

GONZÁLEZ, A. E. G.; TAYLOR, M. L.; QUESADA, E. C. Aspectos relevantes del marcador molecular Hcp100 de *Histoplasma capsulatum* y su potencial uso terapéutico en la histoplasmosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, Cidade do México, v.29, n. 3, p. 115-119, out. 2011.

GUIMARÃES, A. J. et al. Agglutination of *Histoplasma capsulatum* by IgG monoclonal antibodies against Hsp60 impacts macrophage effector functions. **Infect Immun**, v. 79, n. 2, p. 918-27, Feb 2011.

GUIMARÃES, A. J.; NOSANCHUK, J. D.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. Diagnosis Of Histoplasmosis. **Braz. J. Microbiol.**, v. 37, n. 1, p. 1-13, jan. 2006.

GULLO, F.P. Antifúngicos naturais e sintéticos: estudo dos mecanismos de ação em sistema de infecção *in vitro* empregando cepas de *Cryptococcus*. **Dissertação de Mestrado**, 2012.

HALL-STOODLEY, L., COSTERTON, J. W. & STOODLEY, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nat Rev Microbiol** 2, 95–108.

HAN, Y.; LEE, J.H. Berberine Synergy with Amphotericin B against Disseminated Candidiasis in Mice. **Biol. Pharm. Bull.**, v.28 (3), p.541-544, 2005.

HAN, Y.; Synergic effect of grape seed extract with amphotericin B against disseminated candidiasis due to *Candida albicans*. **Phytomedicine**, v.14, p.733–738, 2007.

HARRINGTON, B. J.; HAGEAGE, G. J. **Calcofluor white: a review of its uses and applications in clinical mycology and parasitology**. Lab Med. 34: 361-367 p. 2003.

HILTY J, GEORGE SMULIAN A, NEWMAN SL. *Histoplasma capsulatum* utilizes siderophores for intracellular iron acquisition in macrophages. *Med Mycol*. Aug;49(6):633-42, 2011.

HOCHSTRASSER, D.F.; WILLIAMS, K.L. Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology & genetic engineering reviews**, Newcastle, v.13, p.19-50, 1995.

HOLBROOK, E. D. et al. Definition of the extracellular proteome of pathogenic-phase *Histoplasma capsulatum*. **J Proteome Res**, v. 10, n. 4, p. 1929-43, Apr 2011.

HOLBROOK, E. D.; RAPPLEYE, C. A. *Histoplasma capsulatum* pathogenesis: making a lifestyle switch. **Curr Opin Microbiol**, v. 11, n. 4, p. 318-24, Aug 2008.

HRÁDKOVÁ, I.; MERKL, R.; SMIDRKAL, J.; KYSELKA, J.; FILIP, V. Antioxidant effect of mono- and dihydroxyphenols in sunflower oil with different levels of naturally present tocopherols. **Eur J Lipid Sci Technol**, v. 115, n. 7, p. 747-755, jul. 2013.

JIMENEZ, R.A.; URAN, M.E.; BEDOUT, C. de; ARANGO, M.; TOBON, A.M.; CANO, L.E.; RESTREPO, A.; de BEDOUT, C. Acute histoplasmosis outbreak in a family group: identification of infection source. **Biomedica**, v. 22(2), p. 155-159, 2002.

KAMMANN, U. et al. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. **Mutat Res**, v. 498, n. 1-2, p. 67-77, Nov 2001.

KANETSUNA, F.; CARBONELL, L. M. Cell wall composition of the yeastlike and mycelial forms of *Blastomyces dermatitidis*. **J Bacteriol**, v. 106, n. 3, p. 946-8, Jun 1971.

KASUGA, T. et al. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. **Mol Ecol**, v. 12, n. 12, p. 3383-401, Dec 2003.

KASUGA, T.; TAYLOR, J. W.; WHITE, T. J. Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 3, p. 653-63, Mar 1999.

KAUFFMAN, C. A. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 1, p. 115-32, Jan 2007.

KLOSE J, KOBALZ U. Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. **Electrophoresis**. Jun;16(6):1034-59, 1995.

KLOSE, J.; KOBALZ, U. 2-Dimensional electrophoresis of proteins – an update protocol and implications for a functional analysis of the genome. **Electrophoresis**, Weinheim, v.6, n.16, p. 1034-1059, 1995.

KOMAIID, A.G.; DURAN, E.L. Histoplasmosis in northwestern Argentina. Prevalence of *Histoplasma capsulatum* and paracoccidioidomycosis in the population of Chuasca, Gonzalo and Protero in the province of Tucuman. **Mycopathologia**, v. 129, p. 17-23, 1995.

KOSTAKIOTI, M., M. HADJIFRANGISKOU, AND S.J. HULTGREN, Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 3(4), 2013.

KUROKAWA, C. S.; SUGIZAKI, M. F.; PERAÇOLI, M. T. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 40, n. 3, p. 125-35, 1998 May-Jun 1998.

KWON, Y.I.; VATTEM, D. A.; SHETTY, K. Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. **Asia Pac J Clin Nutr.**, v. 15, n. 1, p. 107-118, 2006.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. **Medical Mycology**. 1^a ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1992.

LACAZ, C. S. et al. **Guia para identificação: fungos actinomicetos e algas de interesse médico.** São Paulo: Sarvier, 1998.

LACAZ, C. S. Histoplasmose. In: LACAZ, C. S.; PORTO, E., et al. (Ed.). **Tratado de Micologia Médica Lacaz.** São Paulo: Sarvier, 2002. p.594-617.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; DE MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica,** Sarvier: São Paulo, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAHTCHEV, K.L.; BATOVSKA, D.I.; PARUSHEV, S.P., UBIYVOVK, V.M.; SIBIRNY, A.A. Antifungal activity of chalcones: a mechanistic study using various yeast strains. **Eur J Med Chem.**43, 2220-2228, 2008.

LEITE, F.S. **Perfil fenotípico e de expressão de proteínas de *Cryptococcus neoformans* após tratamento com substâncias obtidas da planta *Pterogyne nitens*.** 2010. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP – Araraquara, 2010.

LI, H.; LU, Q.; WAN, Z.; ZHANG, J. In vitro combined activity of amphotericin B, caspofungin and voriconazole against clinical isolates of *Trichosporon asahii*. **Int J Antimicrob Agents**, v.35(6), p.550-552, 2010.

LIMAYE, A.P.; CONNOLLY, P.A.; SAGAR, M.; FRITSCHKE, T.R.; COOKSON, B.T.; WHEAT, L.J.; STAMM, W.E. Transmission of *Histoplasma capsulatum* by organ transplantation. **New England Journal of Medicine**, v. 343(16), p. 1163-1166, 2000.

LIN, C. Y.; HUANG, C. S.; CHUANG, C. Y.; YIN, M. C. Anticoagulatory, Antiinflammatory, and Antioxidative Effects of Protocatechuic Acid in Diabetic Mice. v. 57, n. 15, p. 6661-6667, ago. 2012.

LIN, R.D.; CHIN, Y.P.; LEE, M.H. Antimicrobial Activity of Antibiotics in Combination with Natural Flavonoids against Clinical Extended-Spectrum β – Lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumonia*. **Phytother. Res.**, v.19, p.612–617, 2005.

LIN, W. L.; HSIEH, Y. J.; CHOU, F. P.; WANG, C. J.; CHENG, M. T.; TSENG, T. H. Hibiscus protocatechuic acid inhibits lipopolysaccharide-induced rat hepatic damage. **Arch Toxicol.**, v. 77, n. 1, p. 42-47, jan 2003.

LIU, W.H.; HSU, C. C.; YIN, M. C. In Vitro Anti-Helicobacter pylori Activity of Diallyl Sulphides and Protocatechuic Acid. **Phytother Res.**, v. 22, n. 1, p. 53-57, jan. 2008.

LÓPEZ CE. [Dimorphism and pathogenesis of Histoplasma capsulatum]. **Rev Argent Microbiol.** Oct-Dec;38(4):235-42, 2006.

LOPEZ, M.F. Proteome analysis I. Gene products are where the biological action is. **Journal of chromatography**, Amsterdam, v.722, n. 1, p. 191-202, 1999.

MARQUES, S.A.; RUIZ, L.R.B.; FRAMIL, V.M.S. **Compêndio de Micologia Médica**. 2ª edição. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2010. p. 62, 313-322. **Med.** Jan 1;165(1):195-210, 1987.

MENDES-GIANNINI, M.J.; MONTEIRO DA SILVA, J.L.; DE FÁTIMA DA SILVA, J; DONOFRIO, F.C.; MIRANDA, E.T.; ANDREOTTI, P.F.; SOARES, C.P. Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. **Mycopathologia**;165(4-5):237-48. 2008.

MIMS, C.; PLAYFAIR, J.; ROITT, I.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R. Microbiologia Médica. 2ª ed. Manole. São Paulo. 1999.

MONDS, R.D. AND G.A. O'TOOLE, The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. **Trends Microbiol** 17(2): p. 73-87, 2009.

MURPHY, A. R. & KAVANAGH, K. A. Adherence of clinical isolates of *Saccharomyces cerevisiae* to buccal epithelial cells. **Med Mycol**, v. 39, p. 123-27, 2001.

NEGRONI, R.; TABORDA, A.; BENETUCCI, J. Manifestaciones cutaneo mucosas de la histoplasmosis en pacientes con SIDA. **Revista Argentina de Micologia**, v. 71, n. 2, p. 71-78, 1990.

NEWMANN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NOSANCHUK, J.D.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M.; HAMILTON, A.J.; GUIMARÃES, A.J. Antibody therapy for histoplasmosis. **Front. Microb.**, v.3, 2012.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; MERTENS-TALCOTT, S.; TALCOTT, S. T. Chemical Composition, Antioxidant Properties, and Thermal Stability of a Phytochemical Enriched Oil from Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). **J Agric Food Chem.**, v. 56, n. 12, p. 4631-4636, jun. 2008.

PANACKAL, A.A.; HAJJEH, R.A.; CETRON, M.S.; WARNOCK, D.W. Fungal Infections among returning travellers. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, p. 1088-1095, 2002.

PAPHITOU, N.I.; BARNETT, B.J. Solitary parietal lobe histoplasmona mimicking a brain tumour. **Scandinavian journal of Infectious Diseases**, v. 34(3), p. 229-232, 2002.

PATTERSON T.F.; KIRKPATRICK W.E.; WHITE M.H.; HIEMENZ J.W.; WINGARD J.R.; DUPONT B. Invasive aspergillosis: disease spectrum, treatment practices, and outcomes. **Medicine (Baltimore)**, v.79, p.250-60, 2000.

PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, E.T. Comparação de vários métodos de quantificação de biofilme microbianas cultivadas em placas de poliestireno. **J Microbiol Meth** , 72: 157-165, 2008.

PERLIN, D. S.; SETO-YOUNG, D. & MONK, B. C. The plasma membrane H⁺-ATPase of fungi. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 834, p. 609-617, 1997.

PIERCE CG, UPPULURI P, TRISTAN AR, WORMLEY FL JR, MOWAT E, RAMAGE G, LOPEZ-RIBOT JL. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nat Protoc** 3(9):1494-500, 2008.

PIERCE, C. G.; UPPULURI, P.; TUMMALA, S.; LOPEZ-RIBOT, J. L. A 96 Well Microtiter Plate-based Method for Monitoring Formation and Antifungal Susceptibility Testing of *Candida albicans* Biofilms. **Journal of Visualized Experiments.**, v. 44. Out. 2010.

PITANGUI, N. S. - Análise proteômica diferencial do biofilme de *histoplasma capsulatum* e implicações na interação fungo-hospedeiro. **Tese de Mestrado**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

PITANGUI, N.S. *et al.* Adhesion of *Histoplasma capsulatum* to pneumocytes and biofilm on an abiotic surface. **Biofouling**. v. 28, n.7, 2012.

PRADO; M. *et al.* Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v.104, n.3, 2009.

PRASHAR, H.; CHAWLA, A.; KUMAR, S.; KHARB, R. Chalcone as a versatile moiety for diverse pharmacological activities. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, Jalandhar, v. 3, n. 7, p.1913-1927, 2012.

RABILLOUD, T., Ed. Proteome Research: Two-dimensional gel electrophoresis and identification methods. Principles e pratique. Berlin: Springer Verlag, Principles e practice. v.I, p.248, 2000.

RAI, M.; MARES, D. (Editors) Plant-derived antimycotics: current trends and future prospects. **The Hawort Press**, p. 1-41, 2003.

RAMAGE G.; WALLE, K. V.; WICKES, B. L.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. Standardized Method for In Vitro Antifungal Susceptibility Testing of *Candida albicans* Biofilms. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, n. 9, p. 2475-2479, jun. 2001.

RAMAGE, G.; MOWAT, E.; JONES, B.; WILLIAMS, C.; LOPEZ-RIBOT, J. Our current understanding of fungal biofilms. **Crit Rev Microbiol.**, v. 35, n. 4, p. 340-355, ago.2009.

RAPPLEYE CA, EISSENBERG LG, GOLDMAN WE. *Histoplasma capsulatum* alpha-(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the beta-glucan receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**. Jan 23;104(4):1366-70, 2007.

REIS, B.; MARTINS, M.; BARRETO, B.; MILHAZES, N.; GARRIDO, E. M.; SILVA, P.; GARRIDO, J.; BORGES, F. Structure-Property-Activity Relationship of Phenolic Acids and Derivatives. Protocatechuic Acid Alkyl Esters. **J Agric Food Chem.**, v. 58, n. 11, p. 6986-6993, jun. 2010.

RENDUELES, O. AND J.M. GHIGO, Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. **FEMS Microbiol Rev**, 2012.

RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; BERENGUER, J.; MARTINEZ-SUAREZ, J.V.; SANCHEZ, R. Comparison of a spectrophotometric microdilution method with RPMI-2% glucose with the National Committee for Clinical Laboratory Standards reference macrodilution method M27-P for in vitro susceptibility testing of amphotericin B, flucytosine, and fluconazole against *Candida albicans*. **Antimicrob. Agents. Chemother.**; v. 40, p.1998-2003, 1996.

RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; RODERO, L.; CUENCA-ESTRELLA, M.; CÓRDOBA, S. III Curso hispano-argentino de Micología Médica-determinación de la resistencia a los antifúngicos em el laboratorio. 2003.

ROSINHA, M. Y. - **Desenvolvimento de protótipos antifúngicos contra biofilmes de *Histoplasma capsulatum*** 50 f. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica Araraquara, 2013.

SABATELLI, F.; PATEL, R.; MANN, P.A.; MENDRICK, C.A.; NORRIS, C.C.; HARE, R.; LOEBENBERG, D.; BLACK, T.A.; MCNICHOLAS, P.M. In vitro activities of Posaconazole, Fluconazole, Itraconazole, Voriconazole, and Amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 6, p. 2009-2015, 2006.

SANTOS-OLIVEIRA, R.; COULAUD-CUNHA, S.; COLAÇO, W. Review of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribution to the studies of pharmacological properties. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2B, p. 650-659, 2009.

SARDI, J.C.; ALMEIDA, A.M.; MENDES GIANNINI, M.J. New antimicrobial therapies used against fungi present in subgingival sites - A brief review. **Arch Oral Biol.**, v. 56, n. 10, p. 951-959, out. 2011.

SARDI, J.C.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; MENDES GIANNINI, M. J. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **J Med Microbiol.** v. 62, n. 1, p. 10-24, jan. 2013.

SEIDLER MJ, SALVENMOSER S, MULLER FM. 2008. *Aspergillus fumigatus* forms biofilms with reduced antifungal drug susceptibility on bronchial epithelial cells. **Antimicrob Agents Chemother.** 52:4130–4136.3, 2006.

SHIN, S.; KANG, C.A., Antifungal activity of the essential oil of *Agastache rugosa* Kuntze and its synergism with ketoconazole. **Lett. Appl Microbiol.**, v.36, p.111-115, 200

SIXEL, P.J.; PECINALLI, N.R. Seleção de plantas para pesquisa farmacológica. **Infarma**, v. 15, n. 3-4, p. 70-73, 2002.

SOARES, LA; GULLO, FP; SARDI, JC; PITANGUI, NS; COSTA-ORLANDI, CV; SANGALLI-LEITE F, SCORZONI L, REGASINI LO, PETRÔNIO MS, SOUZA PF, SILVA DH, MENDES-GIANNINI MJ, FUSCO-ALMEIDA AM. Anti-trichophyton activity of protocatechuates and their synergism with fluconazole. **Evid. Based Complement Alternat Med**. Epub jun 18, 2014.

SOARES, L. A. - Estudo da atividade antidermatofítica de protocatecuatos contra *T. rubrum* e *T. interdigitale*. 2011. **Tese de Mestrado** - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

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

SZANISZLO, PJ, editor: Fungal dimorphism: with emphasis on fungi pathogenic for humans, New York, **Plenum Press**, 1985.

TARASZKIEWICZ, A., et al., Innovative strategies to overcome biofilm resistance. **Biomed Res Int**, 2013. 2013

WALGREN JL, THOMPSON DC. Application of proteomic technologies in the drug development process. **Toxicol Lett**. 2004 Apr 1;149(1-3):377-85, 2004.

WASHBURN MP, WOLTERS D, YATES JR 3RD. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. **Nat Biotechnol**. 2001 Mar;19(3):242-7, 2001.

WEINBERG CR. Methods for detection of parent-of-origin effects in genetic studies of case-parents triads. **Am J Hum Genet.** 1999 Jul;65(1):229-35, 1999.

WHEAT J, MARICHAL P, VANDEN BOSSCHE H, LE MONTE A, CONNOLLY P. Hypothesis on the mechanism of resistance to fluconazole in *Histoplasma capsulatum*. **Antimicrob Agents Chemother.** Feb;41(2):410-4, 1997.

WHEAT LJ, CONNOLLY P, SMEDEMA M, DURKIN M, BRIZENDINE E, MANN P, PATEL R, MCNICHOLAS PM, GOLDMAN M. Activity of newer triazoles against *Histoplasma capsulatum* from patients with AIDS who failed fluconazole. **J Antimicrob Chemother.** 2006

WHEAT, J.; SAROSI, G.; MCKINSEY, D.; HAMILL, R.; BRADSHER, R.; JOHNSON, P.; LOYD, J.; KAUFFMAN, C. Practice Guidelines for the Management of Patients with Histoplasmosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, p. 688-695, 2000.

WHITE, T. C.; KIEREN, A.M. & BOWDEN, R. A. Clinical, cellular, and molecular factor that contribute to antifungal drug resistance. **Clin. Microbiol. Reviews**, v. 11, p. 382-402, 1998.

WILKINS MR, SANCHEZ JC, GOOLEY AA, APPEL RD, HUMPHERY-SMITH I, HOCHSTRASSER DF, WILLIAMS KL. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnol Genet Eng Rev** 13:19-50, 1996.

WOODS, J.P.: *Histoplasma capsulatum*: Molecular genetics, pathogenesis and responsiveness to environment. **Fungal Genetic Biology**, v. 35, p. 81-97, 2002.

WORTHINGTON, R.J., J.J. RICHARDS, and C. MELANDER, Small molecule control of bacterial biofilms. **Org Biomol Chem** 10(37): p. 7457-74, 2012.

YANG, B.; LU, L.; LI D.; LIU, L.; HUANG, L.; CHEN, L.; TANG, H.; , WANG, L.. Colonic involvement in disseminated histoplasmosis of an immunocompetent adult: case report and literature review. **BMC Infect Dis.**, v. 13, p. 143. Mar 2013.

ZACCHINO, S.A.; YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V.; ENRIZ, R.D.; KOUZNETSOV, V.; RIBAS, J.C. The need for new antifungal drugs: screening for antifungal compounds with a selective mode of action with emphasis on the inhibitors of the fungal cell wall. In: **Planta Med.** Aug;76(11):1044-63, 2010.

ZAITS, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, S.A.; RUIZ, L.R.B.; FRAMIL, V.M.S. **Compêndio de Micologia Médica.** 2ª edição. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2010.

ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M.; TAVARES, P.M.S.; MUNIZ, M.M. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains in Brazil. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 45, p. 443-449, 2005.

ZUANAZZI, J. A. S. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O., et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento:** Ed. UFSC p.499-526, 2001.

Capítulo 2

Nonyl Protochatechuate: a potential compound able to damage *H. capsulatum* biofilms

Luana Rossi Oliveira Midoricava^{a*}, Nayla de Souza Pitangui^a, Janaína de Cássia Orlandi Sardi^a, Gabriela Rodríguez-Arellanes^b, Maria Lucia Taylor^b, Luis Octavio Regasini^c, Maria José Soares Mendes-Giannini^a, Ana Marisa Fusco-Almeida^{a*}

^a Departamento de Análises Clínicas, Laboratório de Micologia Clínica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, 14800-901, Brasil

^b Laboratorio de Inmunologia de Hongos, Departamento de Microbiologia y Parasitologia, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, 04510, México

^c Departamento de Química e Ciências Ambientais, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São Paulo, 15054-000, Brasil

* Corresponding author. Departamento de Análises Clínicas, Laboratório de Micologia Clínica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, 14800-901, Brasil. Tel.: +55 16 33014637.

E-mail address: oli_luarossi@hotmail.com; ana.marisa@uol.com.br

ABSTRACT

The *Histoplasma capsulatum* is a causative agent of histoplasmosis, a systemic fungal disease that is a major health problem worldwide, affecting mainly immunocompromised individuals. Recently it was found that *H. capsulatum* is able to form a biofilm. The microbial cells in biofilm are known to be more virulent than planktonic cells, once presents biologic property that increase the infection activity of the microorganisms. Thus, the development of molecules with anti-biofilm activity is a promising strategy, since the biofilm are more resistance to conventional therapy. So, the aim of this study was characterize the *H. capsulatum* biofilm (EH-317 strain) and evaluated the action of 96 compounds against the planktonic and biofilm of this yeast. The characterization of biofilm formation and the action of the compound was proceed by scanning electron microscopy. Safranin and crystal violet assays were used for quantification of extracellular matrix and cell wall, respectively. The determination of the metabolic activity was performed by XTT reduction assay. So, we can suggest that the nonyl protochatechuate can be *H. capsulatum* anti-biofilm once was capable to promote a inhibition in biofilm cells as well as significantly reduce the extracellular matrix and cell wall.

Keywords: *H. capsulatum*; biofilm; nonyl protochatechuate.

1. Introduction

The ability of *H. capsulatum* to form biofilms have been focus of research once presents complex structures in the pathogenesis of histoplasmosis *in vitro* [1]. Costerton (2001) [2] reported a more complex definition of biofilm affirming that the cells irreversibly fixed on a surface or interface are inserted into extracellular polymeric substances produced by themselves. Moreover, microbial cells growing in a biofilm are physiologically distinct from planktonic cells of the same organism, and biofilms cells express genes different from those of planktonic cells. The formation of biofilm begins with a reversible adhesion on biomaterial surface or host cell through physical-chemical interactions as electrostatics and Van de Waals forces [3] and [4]. After that the microorganisms consolidates the fixation by adhesions action and form an exopolysaccharide complex. This step is called as irreversible adhesion [5]. Rendueles et al. (2012) [6] show that irreversibly adhered cells are still susceptible to antimicrobial agents. The exopolysaccharide production promotes the formation of extracellular matrix that is composed by polysaccharides, proteins, phospholipids, lipids [7] and [8]. The biofilm mature exhibits aqueous channels that allow the transport of metabolites, nutrients and water, passing of planktonic cells and the removal of potentially toxic metabolites [9]. However, cells that are in the deepest layer of the biofilm remain in dormancy state and infrequently divided [4]. Recently it was discovery that the *H. capsulatum* is able to form *in vitro* biofilm. This fact has led researches to investigate the mechanisms involved in the biofilm formation of *H. capsulatum* as well as the search for new targets for therapy of histoplasmosis. So, this study aimed to evaluate the *in vitro* susceptibility of *H. capsulatum* var. *capsulatum* to the 96 compounds of natural origin, as

well as to determine the *in vitro* antifungal activity of these compounds against biofilms of this pathogen.

2. Materials and methods

A yeast strain (EH-317) of *H. capsulatum* var. *capsulatum* from human were obtained from the *H. capsulatum* Culture Collection of the Fungal Immunology Laboratory of the Department of Microbiology and Parasitology, from the School of Medicine, National Autonomous University of Mexico (UNAM) (www.histoplas-mex.unam.mx). This collection is registered in the database of the World Federation for Culture Collections under the number LIH-UNAM WDCM817. The strain was cultivated in Brain Heart Infusion (BHI) supplemented with 0.1% of cystein and 1% of glucose at 37°C.

2.1. Biofilms formation

The biofilm formation was performed according described by Pitangui et al. (2012) [1], with modification. 500 µl of yeast suspension (5×10^6 cells mL⁻¹) were added to 24 well plates and then incubated in an orbital shaker at 37°C for 7 h at 80 rpm for biofilm pre-adhesion. After pre-adhesion the supernatant was removed and added 2 mL of supplemented BHI and plates were further incubated for 96 h. After incubation the supernatant was removed again and the wells were washed with 1000 µl of phosphate saline buffer - PBS (0.01M pH 7.2). As control (with no biofilm formation) the wells were filled with sterile medium.

2.2. Measurement of biofilm metabolic activity by XTT assay

The biofilm formation were evaluated through metabolic activity of *H. capsulatum* by 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5 - [carbonilo (fenilamino)]-2H-tetrazólio-hidróxido reduction assay (XTT) as described for Martinez and Casadevall 2006 [10]. 50 μ l of XTT salt solution (1 mg mL⁻¹ in PBS) and 4 μ l of menadione solution (1 mM in ethanol; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were added to each well contain the *H. capsulatum* biofilm and incubated at 37°C for 3 h. The colorimetric reaction that correlates with cell viability was measured using a microtiter reader at 490nm.

2.3. Scanning Electron Microscopy (SEM) in *H. capsulatum* biofilms

The SEM of *H. capsulatum* biofilm was processed according the method described by (Morris *et al.*, 1997) [11] and modify by (Ells and Hansen, 2006) [12]. Initially, the samples containing *H. capsulatum* biofilm were washed three times with PBS to remove no adhere cells. Then, the biofilm was fixed with 2.5% glutaraldehyde for 18 h at 4°C. The samples were washed with PBS and dehydrated with an increasing gradient of ethanol, from 25% to 100% ethanol, at room temperature. After that the biofilms were dried using the critical point method in a Samdri 780A desiccator (Rockville, MD, USA) using CO₂.

2.4. Confocal Laser Scanning Microscopy in *H. capsulatum* biofilms

The *H. capsulatum* mature biofilm was stained using the dyes CAAF (Concanavalin A – conjugate to Alexa fluor 488 – *Molecular Probes*) and FUN 1 (*Molecular Probes*, USA). A solution of FUN 1 (10 μ g/mL)/ CAAF 488 (25 μ g/mL) in 3 mL of steril PBS was add to well contain lamin with biofilm and then was incubated for 45 min to 37 °C, with no light [13], [14] and [15]. After the incubation the lamin were washed with

distilled water and inverted into 4 μ L de Fluoromount-G (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

2.5. Quantification Assay of Biofilms Extracellular Matrix (ECM) by Safranin staining

The extracellular matrix produced by the biofilm was quantified by staining with safranin as described in Seidler et al. (2008) [16] and Costa Orlandi et al. (2014) [17]. The quantification was performed at 24, 48, 72 and 96 h in 96 well plate. After removing the medium and washing with PBS, the extracellular matrix was stained with 50 μ L of safranin (1%) for 5 min. Then the plates were washed with PBS until the supernatant stayed clear. Finally, the plates were read spectrophotometrically at 492 nm.

2.6. Quantification Assay of Biofilms cell wall by Crystal Violet staining

The mass produced by the biofilm was quantified by staining with crystal violet as described by Costa Orlandi et al. (2014) [17] and Mowat et al. (2007) [18]. The quantification was performed at 24, 48, 72 and 96 h in 96 well plate. After removing the medium and washing with PBS, was added 100 μ L of crystal violet (0.5%) for 5 min. Then the wells were washed with water to remove the dye excess, biofilms were decolorized by the addition of 100 μ L of ethanol (95%). The ethanol solution was gently homogenized with a pipette until the rest of the crystal violet was completely dissolved. The solution was transferred to another plate and read by spectrophotometry at 570 nm.

2.7. Compounds Synthesis

Synthetic compound of protocatechuic acid was prepared as described by de Faria et al. (2012) [19] and detailed by Soares et al. (2014) [20] with minor modifications. Briefly, a 3 mL solution of N, N-dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 1mmol) in *p*-dioxane was added to a cooled (5°C) solution of 0.2 mmol protocatechuic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 20 mmol of *n*-alkyl alcohols in 6 mL of *p*-dioxane. The solution was stirred for 48 h and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was partitioned 3 times with EtOAc and filtered. The filtrate was washed successively with a saturated aqueous citric acid solution (3 times) and saturated aqueous NaHCO₃ (3 times), dried over anhydrous MgSO₄, and evaporated under reduced pressure. The crude products were purified over a silica gel column (0.06–0.20 mm, ACROS Organics, USA) and eluted isocratically with CHCl₃/MeOH (98:2) to produce Protocatechuate nonyl ester.

2.8. Dilution of Test Substances

Protocatechuato of nonila was aseptically solubilized in dimethylsulfoxide (DMSO) as described by Scorzoni et al. (2007) [21]. The compound was diluted in RPMI-1640 media supplemented with 2% glucose, and BHI broth supplemented with 1% glucose and 0.1% L-cysteine.

2.9. Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The evaluation of the antifungal activity of the compound was performed according to the document M27-A3 (2008), proposed by CLSI with modifications. The *H. capsulatum* yeasts were counted with a hemacytometer, and their concentration was adjusted to obtain a final concentration ranging from 2.5×10^3 to 5×10^3 CFU/mL in RPMI 1640

(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). These suspensions were inoculated on 96-well plates (TPP, Trasadigen, Switzerland). 100 μ L of several concentrations of protocatecuato (500-0.92 μ g/mL) were added to 100 μ L of the inoculum. Positive (100 μ L of RPMI medium with 100 μ L of inoculum) and negative (200 μ L of RPMI) controls were included in all experiments. The plates were incubated at 37 °C under stirring for 24 hours and stained with 20 μ L of Alamar Blue ® in each well. As control an ATCC strain of *Candida krusei*, was used.

2.10. MIC in *H. capsulatum* Biofilms

To evaluate the antifungal activity of the compound against *H. capsulatum* biofilm were applied a sensitivity tests. The formation of biofilm *H. capsulatum* was performed as described by Pitangui et al. (2012) [1] with modifications. 100 μ L of inoculum at 5.0×10^6 concentration was added to 96-well plate. The plate was incubated at 37 °C under stirring during the 7 hours required for pre-adhesion. After the 7 hours, the supernatant was removed and added BHI broth supplemented with 1% glucose and 0.1% L-cysteine. Then the plate was incubated again for 96 hours. After the formation of biofilm the supernatant was removed and the biofilm washed three times with PBS.

Serial dilutions of the compound in supplemented BHI broth were added and incubated for 96 h. The growth reduction of fungi was compared to the biofilm growth without drug. The effect of the compound was evaluated from the reduction of metabolic activity assay by colorimetric XTT assay.

2.11. SEM and Confocal Laser Scanning Microscopy in *H. capsulatum* treated Biofilms

MIC results were used to evaluate the morphological changes of mature biofilms after treatment with protocatecuato of nonila. Mature biofilms of *H. capsulatum* were performed in 24-well plates after period of 96 h at 37°C. Its formation was placed in contact with two concentrations of the compound (31.25 and 62.5 mg/mL). The treatment was carried out for a period of 96 h, to better detailed view of the compound action against *H. capsulatum* biofilm, SEM and Confocal Laser Scanning Microscopy were performed.

2.12. Effects of target compound treatment in H. capsulatum biofilms by quantification of extracellular matrix and cell wall

The action of the compound on the extracellular matrix production and biofilm biomass was determined by the crystal violet and safranin assays, respectively. After 96 hours of action of the compound on the mature biofilm, measurements were performed by spectrophotometric readings.

3. RESULTS

3.1. Determination of biofilm metabolic activity

The kinetics of biofilm formation by *H. capsulatum* strain was performed using the colorimetric XTT reduction assay. As result it was observed that the metabolic activity increased in the first 12 hours and remains ascending up to 96 h incubation (Fig. 1). Subsequent measurements revealed that until 122 h of biofilm formation the metabolic activity remains the same that was observed at 96 h (data not shown), suggesting the dissociation of cells from the abiotic surface.

3.2. Scanning Electron Microscopy (SEM) in *H. capsulatum* biofilms

The ability of *H. capsulatum* strain (EH-317 strain) to form a biofilm *in vitro* was observed by scanning electron microscopy. Due the presence of extracellular matrix covering and interconnecting the yeast, after 48h incubation, is possible confirm the *H. capsulatum* biofilm formation. This fact was more evident after 72h of incubation. At 96 h is possible note that the surface is taken by cell clusters surrounded by extracellular matrix (Fig. 2).

3.3. Quantification Assay of Biofilms Extracellular matrix (ECM) and cell wall

Along the formation and maturation of the biofilm, were performed quantification assays to determine ECM and cell wall. The results shows a significant quantify of ECM and cell wall within the first 24 h of development of biofilms. Nevertheless, the highest concentration of matrix, and the wall has been detected in time of 96 h, indicating the total biofilm consolidation (Fig. 3). These results were consistent with the SEM once it was possible to observe a progressive increase in ECM and wall over time.

3.4. Evaluation of Protocatechuate nonyls antifungal against planktonic cultures of *H. capsulatum* (cepa EH-317)

The antifungal activity of protocatechuate nonyl, protocatechuic acid derivative, was evaluated against planktonic cultures of *H. capsulatum*. This compound can be considerate a antifungal to inhibit *H. capsulatum*, once the MIC was 3.95 µg/mL

3.5. Evaluation of nonyl protococatechuate as antifungal against *H. capsulatum* (cepa EH-317) biofilm.

The compound selected nonyl protococatechuate exhibited strong antifungal activity against the planktonic cultures of *H. capsulatum*. For this reason it was also study the action of this compound against *H. capsulatum* biofilm. The results indicate that nonyl protococatechuate presents a strong anti-biofilm activity, once at 62.5 µg/mL concentration was able to reduce the metabolic activity of the *H. capsulatum* biofilm to 58%.

3.6. Effects of nonyl protococatechuate treatment in *H. capsulatum* biofilms by SEM analysis

To evaluate the morphologic damage causes in the *H. capsulatum* biofilm after the treatment by protococatechuate nonyl, was realized SEM analyzes. Fig. 4 clearly illustrates that the compound at 31.25 µg/mL e 62.5 µg/mL concentrations was able to promote a biofilm destruction There is an initial destruction of the extracellular matrix at the concentration of 31.25 mg/mL that increase at MIC.

3.7. Effects of nonyl protococatechuate treatment in *H. capsulatum* biofilms by Confocal Laser Scanning Microscopy

Images of a mature biofilm *H. capsulatum* were acquired by confocal microscopy. The red color emitted by FUN 1 is dense aggregates in the cytoplasm of metabolically active cells, while the intense green color results from the binding of Concanavalin A

glucose and mannose of the fungal cell wall. Images orthogonal biofilm EH-317 from *H. capsulatum* strains were analyzed to determine the thickness and biofilm architecture. The sections of the three-dimensional image show that the *H. capsulatum* biofilm has 25µm thickness (Fig. 5).

Images of *H. capsulatum* biofilm after treatment with nonyl protococatechuate were obtained by Confocal Laser Scanning Microscopy. Orthogonal images of *H. capsulatum* biofilm treated were analyzed in order to determine if the compound had an influence on the biofilm thickness and architecture. The sections of the three-dimensional image reveal that the selected compound acts on the dimensional structure of *H. capsulatum* biofilm, once occurred a significant reduction in the thickness of the treated biofilms (14 mM) when compared to thicknesses of the biofilm without treatment (25 mM) (Fig. 5).

3.8. Effects of nonyl protococatechuate treatment in *H. capsulatum* biofilms by quantification of extracellular matrix and cell wall

The results obtained after quantification of ECM and cell wall consistent with the results presented in confocal and SEM of the treated biofilms. We observed in both techniques that the treatment with nonyl protococatechuate (62,5 µg/mL) was efficient to reduce 48% of ECM and 61% of cell wall (Fig. 6). Statistical analysis was performed by Student's t-test.

4. DISCUSSION

The protocatechuic acid, a fully synthetic compound of vegetable origin [20], has been reported in several plants, such as flowers of *Hibiscus sabdariffa* [22], sunflower oil

[23], garlic [24], plants of the Lamiaceae family (oregano, lemon balm) [25] and Eucommia [26]. Protocatechuic acid esterification reactions permit to obtain the protocatechuic acid esters, or protocatecuatos. For these reactions it is possible to provide compounds that have better solubility in non-polar media, once increase the compound lipophilicity. The introduction of alkyl groups to carboxylic acid group produces radicals of several sizes, resulting in different protocatecuatos [27]. The antioxidant action is the main activity presented by protocatechuic acid. This property is a target of research involving phenolic compounds and have been reported by several authors [25]. Additionally, other authors describe an antimicrobial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Helicobacter pylori* [24]. In this context, Soares et al. (2014) [20] also detected, potential activity of protocatechuic acid and some of its derivatives against dermatophytes and reports that the difference in activity between different synthetic derivatives appears to be related to their different carbon chains.

The results obtained in the current study show that Protochatechuate nonyl has strong antifungal activity *in vitro* against *H. capsulatum* yeasts in planktonic cultures and what is more surprising, this compound triggered damage in *H. capsulatum* biofilms. The urgency of a new agent for the treatment of fungal infections is necessary in view of estimates that point to death from 1.5 to 2 million people with fungal infections, exceeding the rate of deaths from malaria and tuberculosis. Indeed, the effectiveness of antifungal therapy has steadily increased with the emergence of second-generation azoles, echinocandins and lipid formulations of amphotericin B, however they are still not considered an ideal alternative therapy. According to Denning and BromLey (2015) [28],

new options are urgently needed, in part by inadequate response rate and also for side effects and resistance. This problem worsens since cells in biofilms increased the resistance to antimicrobial agents [29], once the microorganism presents mechanisms of resistance such as production of extracellular matrix, efflux pump activity, cell density, overexpression of targets of drugs, response to stress and general physiology of the cell that differs from planktonic cells [30]. Pitangui et al. (2012) [1] reported that *H. capsulatum* it has the ability to form biofilm *in vitro* and to adhere to host epithelial cells A549. So, these authors suggest that the formation of biofilms during infection may be related to the fungus's ability to suppress the immune system of the host.

In this study, the concentration of Protocatechuate nonyl (3.95 µg / mL) to inhibit *H. capsulatum* was similar to other fungi such as *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*, which varied between 1.95 and 3.90 µg / mL, respectively [20]. This suggests that this derived from protocatechuic acid has strong antifungal activity against yeasts and filamentous fungi.

The XTT assay results shows that the metabolic activity of *H. capsulatum* biofilm was significantly more reduced in the treatment with Protocatechuate nonyl than with the treatment with antifungal agents as itraconazole and amphotericin B. This fact is evidenced by recent studies by Brilhante et al. (2015) [31] which demonstrated that these drugs reduce the metabolic activity of biofilm on average by 14% when tested at equivalent concentrations of 15 x MIC. Our results shows that the Protocatechuate nonyl at 15 x MIC, was able to reduce approximately 58% metabolic activity of biofilm.

In this study we also analyzed the biomass of biofilm treated through crystal violet staining technique, and also we quantify the ECM by safranin staining technique. The results show that the Protocatechuate nonylpromotes reduction of 61% biomass and 48% in the production of ECM. Safranin technique has been employed by several authors as an easy approach for the quantification of fungal and bacterial biofilms, by determining exopolymeric substances [17], [32], [33], [34] and [35]. Other authors have also explored this approach to determine the effect caused by plant extracts in the production of microbial biofilms [36].

In addition, staining with crystal violet have also been widely used for quantification of the biofilm biomass [17] and [37]. Crystal violet binds to surface molecules that are negatively charged and also bind to polysaccharide that is a biofilm constituent of the ECM [38]. The data obtained by safranin and crystal violet techniques confirmed the SEM images and Confocal Laser Scanning Microscopy results, once the drastic damage to the three-dimensional architecture of biofilm observed by microscopy techniques can be justify by significant reduction of biomass and ECM, after the treatment with Protocatechuate nonyl.

To delineate an antifungal prototype for the development of a new therapy for fungal infections, cytotoxicity assays are needed. In this context, Soares et al. (2014) [20] determined the appropriate concentration of some derivatives of protocatechuic acid to promote 50% of lethality (IC₅₀) in normal oral keratinocytes (NOK) and the results shows that the Protocatechuate nonylexhibited IC₅₀ of 52.1 µg/mL. Despite higher concentrations could demonstrate cytotoxicity, it is indisputable that the Protocatechuate nonylmay have adjuvant action to antifungal drugs, increasing the sensitivity of yeasts in

planktonic cultures and biofilms. In addition, *in vivo* trials involving mammals and alternative models are needed to validate the promising results obtained *in vitro*.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Acknowledgments: financial support by CAPES and FAPESP

5. REFERENCES

- [1] Pitangui NS, Sardi JC, Silva JF, Benaducci T, Moraes da Silva RA, Rodríguez-Arellanes G, Taylor ML, Mendes-Giannini MJ, Fusco-Almeida AM. Adhesion of *Histoplasma capsulatum* to pneumocytes and biofilm formation on an abiotic surface. *Biofouling*. 2012;28(7):711-8.
- [2] Costerton, J. W. Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. *Trends Microbiol* 2001;9(2):50-2.
- [3] Worthington, R.J., J.J. Richards, C. Melander, Small molecule control of bacterial biofilms. *Org Biomol Chem* 2012;10(37):7457-74.
- [4] Davies, D., Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2(2):114-22.
- [5] Kostakioti, M., M. Hadjfrangiskou, S.J. Hultgren, Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic Cold Spring Harb *Perspect Med* 2013;3(4):010306.

- [6] Rendueles, O., Ghigo, J.M. Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. FEMS Microbiol Rev 2012.
- [7] Flemming, H.C., T.R. Neu, D.J. Wozniak, The EPS matrix: the "house of biofilm cells". J Bacteriol 2007;189(22):7945-7.
- [8] Estrela, A.B., M.G. Heck, W.R. Abraham, Novel approaches to control biofilm infections. Curr Med Chem 2009;16(12):1512-30.
- [9] Monds, R.D., O' Toole, G.A. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. Trends Microbiol 2009; 17(2): 73-87.
- [10] Martinez, L. R., Casadevall, A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50(3):1021-33.
- [11] Morris, C. E., Monier, J.; Jacques, M. Methods for observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganisms. Appl Environ Microbiol 1997; 63(4): 1570-6.
- [12] Ells, T.C., Hansen, T.L. Strain and growth temperature influence *Listeria* spp. attachment to intact and cut cabbage. Int J Food Microbiol 2006; 111(1): 34-42.
- [13] Ramage G, Walle, K. V, Wickes, B. L, López-Ribot, J. L. Standardized Method for *In Vitro* Antifungal Susceptibility Testing of *Candida albicans* Biofilms. Antimicrob. Agents Chemother 2001;45: 2475-79.
- [14] Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. Infect Immun 2002; 70(2): 878-88.

- [15] Chandra J, Patel JD, Li J, Zhou G, Mukherjee PK, McCormick TS, Anderson JM, Ghannoum MA. Modification of surface properties of biomaterials influences the ability of *Candida albicans* to form biofilmes. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:8795-801.
- [16] Seidler, M. J, Salvenmoser S, Muller FM. *Aspergillus fumigatus* forms biofilms with reduced antifungal drug susceptibility on bronchial epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:4130–36.
- [17] Costa-Orlandi CB, Sardi JC, Santos CT, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJ. In vitro characterization of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* biofilms. *Biofouling*. 2014;30(6):719-27.
- [18] Mowat, E. et al. Development of a simple model for studying the effects of antifungal agents on multicellular communities of *Aspergillus fumigatus*. *J Med Microbiol* 2007; 56:1205-12.
- [19] Faria C. M., Nazaré A. C., Petrônio M. S, Paracatu LC, Zeraik ML, Regasini LO et al., "Protocatechuic acid alkyl esters: hydrophobicity as a determinant factor for inhibition of NADPH oxidase," *Current Medicinal Chemistry* 2012;19(28):4885–93.
- [20] Soares LA, de Cássia Orlandi Sardi J, Gullo FP, de Souza Pitangui N, Scorzoni L, Leite FS. Anti dermatophytic therapy-prospects for the discovery of new drugs from natural products. *Braz J Microbiol* 2014;44(4):1035-41.
- [21] Scorzoni L., Benaducci T., Fusco-Almeida A. M., Silva D. H. S., da Silva Bolzani V., and Gianinni M. J. S. M., The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp., *Brazilian Journal of Microbiology* 2007;38(3):391–97.

- [22] Lin, W. L.; Hsieh, Y. J.; Chou, F. P.; Wang, C. J.; Cheng, M. T.; Tseng, T. H. Hibiscus protocatechuic acid inhibits lipopolysaccharide-induced rat hepatic damage. *Arch Toxicol* 2003;77: 42-47.
- [23] Hrádková, I.; Merkl, R.; Smidrkal, J.; Kyselka, J.; Filip, V. Antioxidant effect of mono- and dihydroxyphenols in sunflower oil with different levels of naturally present tocopherols. *Eur J Lipid Sci Technol* 2013;115:747-55.
- [24] Liu, W.H.; Hsu, C. C.; Yin, M. C. In Vitro Anti-Helicobacter pylori Activity of Diallyl Sulphides and Protocatechuic Acid. *Phytother Res* 2008;22:53-57.
- [25] Kwon, Y.I.; Vatter, D. A.; Shetty, K. Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. *Asia Pac J Clin Nutr* 2006;15:107-18.
- [26] Lin, C. Y.; Huang, C. S.; Chuang, C. Y.; Yin, M. C. Anticoagulatory, Antiinflammatory, and Antioxidative Effects of Protocatechuic Acid in Diabetic Mice 2012;57:6661-7.
- [27] Reis, B, Martins, M, Barreto, B, Milhazes, N, Garrido, E. M, Silva, P, et al. Structure-Property-Activity Relationship of Phenolic Acids and Derivatives. Protocatechuic Acid Alkyl Esters. *J Agric Food Chem* 2010;58(11):6986-93.
- [28] Denning, D.W., Bromley, M.J. How to bolster the antifungal pipeline. *Science* 2015; 347: 1414.
- [29] Martinez, L. R. & Fries, B. C. Fungal biofilms: relevance in the setting of human disease. *Curr Fungal Infect Rep* 2010;4: 266–75.

- [30] Sardi J de C, Pitangui N de S, Rodríguez-Arellanes G, Taylor ML, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJ. Highlights in pathogenic fungal biofilms. *Rev Iberoam Micol* 2014;31(1):22-9.
- [31] Brilhante RS, de Lima RA, Marques FJ, Silva NF, Caetano ÉP, Castelo-Branco D de S, et al. *Histoplasma capsulatum* in planktonic and biofilm forms: in vitro susceptibility to amphotericin B, itraconazole and farnesol. *J Med Microbiol* 2015;64:394-9.
- [32] Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun* 1982; 37:318–326.
- [33] Fessia SL, Griffin MJ. A method for assaying biofilm capacity on polyurethane-coated slides. *Perit Dial Int* 1991;11:144–146.
- [34] Lembke C, Podbielski A, Hidalgo-Grass C, Jonas L, Hanski E, Kreikemeyer B. Characterization of biofilm formation by clinically relevant serotypes of group A streptococci. *Appl Environ Microbiol* 2006;72: 2864–75.
- [35] Standar K, Kreikemeyer B, Redanz S, Münter WL, Laue M, Podbielski A. Setup of an in vitro test system for basic studies on biofilm behavior of mixed-species cultures with dental and periodontal pathogens. *PLoS One* 2010;5(10).
- [36] Limsuwan S, Voravuthikunchai SP. *Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schltr., *Eleutherine americana* Merr. and *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. As antibiofilm producing and antiquorum sensing in *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008;53(3):429-36.

[37] Espina L, Pagán R, López D, García-Gonzalo D. Individual Constituents from Essential Oils Inhibit Biofilm Mass Production by Multi-Drug Resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules* 2015;20(6):11357-72.

[38] Hess, D.J., Henry-Stanley, M.J., Wells, C.L. The Natural Surfactant Glycerol Monolaurate Significantly Reduces Development of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* Biofilms. *Surg Infect (Larchmt)*. 2015 Jun 25. [Epub ahead of print].

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Kinectis of *H. capsulatum* (strain EH 317) biofilm formation in BHI supplemented with glucose (1%) and L-cystein (0.1%). Y axis shows the measures time in hours and the X axis shows the optical density of the sample. Method colorimetric XTT reduction assay.

Fig. 2. Scanning electron microscopy of *H. capsulatum* biofilm formation of (strain EH 317). Formed in BHI supplemented with 1% glucose and 0.1% L-cysteine. The times incubation were 24 h, 48 h, 72 h and 96 h at 37 ° C with 7h of adhesion in PBS. Images in different magnitudes indicating the presence of extracellular matrix indicated by arrows interconnecting the yeast.

Fig. 3. Quantification of extracellular matrix and cell wall during the biofilm formation and maturation of *H. capsulatum* (EH-317 strain). Biofilms were formed in BHI broth supplemented with 1% glucose and 0.1% L-cysteine. ECM and cell wall was quantified by staining for safranin and crystal violet assay, respectively.

Fig. 4. Effects of nonyl protococatechuate treatment in morphologic changes in *H. capsulatum* biofilms (EH-317 strain) at 96 h post-treatment: results of SEM analysis. (A) untreated biofilm. (B) Biofilm treated with nonyl protocatecuato at 31.25 µg/mL concentration. (C) Biofilm treated with nonyl protocatecuato at 62.5 µg/mL concentration.

Fig. 5. Confocal Laser Scanning Microscopy *H. capsulatum* biofilm (EH-317) before (above) and after (below) the treatment with nonyl protococatechuate (62.5 µg/mL). Fungal wall and extracellular matrix marked by ConA- green (final concentration 25µg/mL) (A). Viable cells were stained with FUN 1 -red (final concentration 10 µM) (B). Merged (C) with orthogonal sections (D).

Fig. 6. Effect of nonyl protococatechuate (62.5 mg/mL) in the extracellular matrix and cell wall of the *H. capsulatum* biofilm (strain EH 317), after 96 hours contact. ECM and cell wall was quantified by safranin and violet crystal staining assay, respectively (*p <0.05).