



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE
ARARAQUARA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA
APLICADA À FARMÁCIA**

KAILA PETRONILA MEDINA ALARCÓN

**Biofilmes mistos de *Mycobacterium tuberculosis* e *Paracoccidioides
brasiliensis* e ação de chalcona livre e carregada no sistema
nanoemulsionado**

**ARARAQUARA - SP
2018**

KAILA PETRONILA MEDINA ALARCÓN

Biofilmes mistos de *Mycobacterium tuberculosis* e *Paracoccidioides brasiliensis* e ação de chalcona livre e carregada no sistema nanoemulsionado

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

ORIENTADORA: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida

COORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Pavan

**ARARAQUARA-SP
2018**

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

M491b

Medina-Alarcón, Kaila Petronila.

Biofilmes mistos de *Mycobacterium tuberculosis* e *Paracoccidioides brasiliensis* e ação de chalcona livre e carregada no sistema nanoemulsionado / Kaila Petronila Medina-Alarcón. – Araraquara, 2018.
246 + 58 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de concentração em Microbiologia, Micologia e Nanotecnologia.

Orientadora: Ana Marisa Fusco Almeida.
Coorientador: Fernando Rogério Pavan.

1. *Mycobacterium tuberculosis*. 2. *Paracoccidioides brasiliensis*. 3. Coinfecção. 4. Biofilme misto. 5. chalconas. 6. Nanoemulsão. I. Fusco-Almeida, Ana Marisa, orient. II. Pavan, Fernando Rogério, coorient. III. Título.

CAPES: 50700006

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Estudo da ação de protótipo antifúngico de chalcona carregada por sistema nanoemulsionado contra infecções mistas pulmonares

AUTORA: KAILA PETRONILA MEDINA ALARCÓN DA SILVA

ORIENTADORA: ANA MARISA FUSCO ALMEIDA

COORDENADOR: FERNANDO ROGÉRIO PAVAN

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área de conhecimento: MICOLOGIA pela Comissão Examinadora:



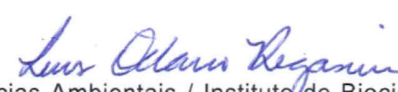
Profa. Dra. ANA MARISA FUSCO ALMEIDA

Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP



Profa. Dra. KATIANY RIZZIERI CALEFFI FERRACIOLI

Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina / Universidade Federal de Maringá



Prof. Dr. LUIS OCTÁVIO REGASINI

Departamento de Química e Ciências Ambientais / Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas do Câmpus de São José do Rio Preto da UNESP



Profa. Dra. MARIA JOSÉ SOARES MENDES GIANNINI

Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP



Prof. Dr. MARLUS CHORILLI

Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

DEDICATÓRIA

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar, a Deus, por todo o amor que me tem, por me abençoar sempre em todo momento. Embora eu não entenda todas as dificuldades que possa ter passado, sei que é para me aperfeiçoar e agradeço por elas, além de pelas conquistas, pois me ajudam a melhorar.

Agradeço também a Deus por ter me abençoado com uma família maravilhosa que me ensina sempre a querer ser melhor. Todas as minhas conquistas são dela também. Por isso, agradeço a minha mãe Cláudia e ao meu pai Modesto, que me ensinaram que tudo na vida se conquista com muito trabalho e honestidade. Aos meus irmãos Rocio, Abner, Ethel, Enech e, em especial, ao David, o mais novo deles. Ao meu esposo Ewerthon Silva, meu companheiro de todas as horas, e aos nossos pequenos Duquesa e Thómas, que são a alegria da casa. Vocês sempre me apoiaram e fortaleceram incondicionalmente, em todos os momentos. Agradeço, ainda, a todos os meus familiares, que sempre demonstraram um carinho enorme, em todos os momentos, e me apoiaram nas minhas decisões.

Agradeço à minha orientadora Professora Dra. Ana Marisa Fusco Almeida e à Professora Dra. Maria José Soares Mendes Giannini, as quais me proporcionaram a oportunidade do meu desenvolvimento profissional no meu doutorado. Agradeço também ao meu co-orientador Professor Dr. Fernando Pavan, e ao Professor Doutor Marlus Chorilli, que me brindou a oportunidade de conhecer e trabalhar com nanotecnologia desde o meu mestrado, o que permitiu que eu tivesse um crescimento profissional nesta área. Agradeço aos dois pela orientação, oportunidade, dedicação e confiança que depositaram em mim, as quais me permitiram evoluir profissionalmente.

Agradeço ao Professor Dr. Luis Octávio Regasini e aos seus alunos do laboratório de Química Medicinal, da Universidade Estadual Paulista, de São José de Rio Preto, por me presentear com a oportunidade de trabalhar com as substâncias que deram origem ao desenvolvimento da minha tese de doutorado.

Agradeço a todos meus colegas do laboratório do Núcleo de Proteômica, supervisionado pela Profas. Dras. Maria José Soares Mendes Giannini e Ana Marisa Fusco Almeida, onde desenvolvi toda a parte fúngica da minha pesquisa, em especial, à Caroline Marcos, pelas contribuições, à técnica Claudia Tavares e ao técnico Paulo César pela ajuda que sempre me deram.

Agradeço a todos meus colegas do laboratório de Microbacteriologia, supervisionado pelo Prof. Dr. Fernando Pavan, que me permitiu o acesso ao laboratório de nível de segurança 3 (NB3), no qual pude desenvolver toda a parte relacionada à formação de *Mycobacterium Tuberculose*. Às técnicas Angélica e Silvia Helena Oliveira agradeço pela ajuda e amizade.

Agradeço a todos meus colegas do laboratório da Farmacotécnica, supervisionado pelo Professor Dr. Marlus Chorilli, no qual desenvolvi o sistema nanoestruturado lipídico e realizei a parte inicial da caracterização físico-química, e à Natália e à Margarethe, professora e técnica do laboratório, respectivamente, pela amizade e ajuda.

Também agradeço a todos meus colegas do laboratório de infecção cirúrgica do departamento de biociências da faculdade de Medicina da *Macquarie University*, supervisionado pela Professora Dra. Karen Vickery, no qual desenvolvi meu doutorado Sanduiche.

Agradeço à Professora Dra. Karen Vickery pela orientação constante ao longo do meu doutorado Sanduíche, pelos conselhos acadêmicos e pessoais, assim como agradeço à Dra. Helen Hu pela co-orientação e ajuda concedida.

A todos meus colegas e, em especial, à Maria Menpim, Khalid Alhojani e Olivia Liang, pela parceria acadêmica, pela amizade e pelo apoio constante durante minha estadia na Austrália. Sou muito grata por essa oportunidade que me foi dada pela CAPES em colaboração com a UNESP.

Por fim, minha gratidão à coordenação do Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia aplicada à Farmácia, a todos os técnicos, ao pessoal da limpeza e ao pessoal administrativo, que nos ajudam sempre e que nos auxiliam no desenvolvimento de nossas pesquisas.

RESUMO

As infecções pulmonares são um problema global e estão classificadas em terceiro lugar entre as principais causas de morte. Entre as infecções pulmonares crônicas estão a tuberculose (TB) e a paracoccidioidomicose (PCM). A TB é uma doença cujo principal agente etiológico é o *Mycobacterium tuberculosis* e a PCM tem como agente etiológico o complexo *Paracoccidioides* spp. As duas doenças podem ocorrer na forma de coinfeção, com incidência aproximada de 2,8 a 5,5% dos casos nos países da América do Sul e 10% no Brasil. Ambos os microrganismos já foram descritos na forma de biofilme monoespécie e o tratamento de ambas as doenças tem merecido atenção, devido a casos de resistência e as poucas opções terapêuticas. Diante do exposto, este trabalho visa mostrar, pela primeira vez, a capacidade de *M. tuberculosis* e *P. brasiliensis* se associarem por meio do crescimento na forma de um biofilme misto *in vitro*, a fim de elaborar um novo protótipo de 3'chalcona carregada numa nanoemulsão com atividade para as formas planctônica e de biofilme. Para isso, inicialmente foi padronizada e caracterizada a formação dos biofilmes monoespécie da linhagem ATCC *M. tuberculosis* (H37Rv), da linhagem clínica (Rv40) e da linhagem de *P. brasiliensis* (Pb18) e dos biofilmes mistos das associações de H37Rv+Pb18 e Rv40+ Pb18 (nesta ordem de crescimento), ambas as associações mostraram um aparente sinergismo entre elas. Na formação do biofilme misto inverso denominado assim pela ordem de associação, onde primeiramente colocou-se a linhagem de *P. brasiliensis* (Pb18), seguida da adição de linhagem ATCC *M. tuberculosis* (H37Rv), formando o biofilme misto (Pb18+H37Rv), foi observada aparente competição entre os microrganismos. Todos os biofilmes, seja monoespécie e mistos se mostraram consolidados entre 30 a 45 dias de formação para todas as situações. Posteriormente avaliou-se a atividade antifúngica e antimicobacteriana dos derivados de chalconas semissintéticas frente às linhagens já relatadas anteriormente na sua forma planctônica. Os melhores resultados foram para a 3'chalcona, a qual foi selecionada para verificação da atividade antibiofilme. Devido à pouca solubilidade e estabilidade da 3'chalcona, foram desenvolvidas três nanoemulsões. Assim, a 3'chalcona foi incorporada na nanoemulsão 1 (SNL+3'chalcona), nanoemulsão 2 sem ergosterol (Me+3'chalcona) e a nanoemulsão 3 com ergosterol (Me+E+3'chalcona), sendo que as duas primeiras possuem colesterol na sua composição e a terceira possui colesterol e ergosterol. Todas as nanoemulsões mostraram uma alta atividade antifúngica e boa atividade antimicobacteriana, melhorando a atividade antifúngica em 4 vezes e em 2 vezes a atividade antimicobacteriana quando comparada com a 3'chalcona livre, além de estas formulações não apresentarem citotoxicidade com altos Índices de seletividade (IS) e alta atividade contra os biofilmes monoespécie, com inibição de até 78%. Também mostraram uma alta inibição dos biofilmes misto, com inibição de até 78% e 76% para H37Rv + Pb18 e Rv40 + Pb18, respectivamente, melhorando a atividade antibiofilme da 3'chalcona livre em até 50%. Além disso, todas as nanoemulsões apresentaram maior atividade antibiofilme do que a rifampicina, fármaco utilizado como controle de tratamento. Portanto, todas as nanoemulsões apresentaram resultados muito promissores; ressalta-se que a nanoemulsão SNL+3'chalcona apresentou os melhores resultados antibiofilme em todas as situações e, poderia se tornar um possível protótipo medicamentoso para o tratamento desta coinfeção.

Palavras chaves: *Mycobacterium tuberculosis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, Coinfeção, Biofilme misto, chalconas, Nanoemulsão.

ABSTRACT

Pulmonary infections are a global problem and rank third among the leading causes of death. Among the chronic lung infections are tuberculosis (TB) and paracoccidioidomycosis (PCM). The TB is a disease whose main etiologic agent is *Mycobacterium tuberculosis* and PCM has the etiological agent *Paracoccidioides* spp. The two diseases may occur in the form of coinfection, with an approximate incidence of 2.8 to 5.5% of the cases in the countries of South America and 10% in Brazil. Both microorganisms have already been described in the form of monospecies biofilm and the treatment of both diseases has deserved attention, due to cases of resistance and the few therapeutic options. In view of the above, this research aims to show, for the first time, the ability of *M. tuberculosis* and *P. brasiliensis* to associate by means of growth in the form of a mixed biofilm *in vitro*, in order to elaborate a new prototype in a nanoemulsion with activity for planktonic and biofilm forms. For this purpose, it was initially standardized and characterized the formation of monospecies biofilms of the ATCC strain *M. tuberculosis* (H37Rv), the clinical lineage (Rv40) and the *P. brasiliensis* (Pb18) lineage and the mixed biofilms of the associations of H37Rv + Pb18 and Rv40 + Pb18 (in this order of growth), both associations showed an apparent synergism between them. In order to establish the mixed biofilm (Pb18 + H37Rv), it was first proposed the association of *P. brasiliensis* (Pb18), followed by ATCC *M. tuberculosis* (H37Rv) with order of inverse growth, in this association a apparent competition between the microorganisms was observed. All biofilms, monospecies and mixed, were consolidated from 30 to 45 days of training for all situations. Subsequently, the antifungal and antimycobacterin activity of the semi-synthetic chalcone derivatives were evaluated against the strains previously reported in their planktonic form. The best results were for 3'chalcona, which was selected for verification of antibiofilm activity. Due to the poor solubility and stability of 3'chalcone, three nanoemulsions were developed. Thus, 3'chalcona was incorporated into nanoemulsion 1 (SNL + 3'chalcona), nanoemulsion 2 without ergosterol (Me + 3'chalcona) and nanoemulsion 3 with ergosterol (Me + E + 3'chalcona), both of which The first nanoemulsions have cholesterol in their composition and the third nanoemulsion has cholesterol and ergosterol. All the nanoemulsions showed a high antifungal activity and good antimycobacterial activity, improving the antifungal activity in 4 times and in 2 times the antimycobacterial activity when compared with 3'chalcona free. Besides these formulations did not present cytotoxicity with high selectivity indices (IS) and showed high activity against monospecies biofilms, with up to 78% inhibition. They also showed a high inhibition of mixed biofilms, with inhibition of up to 78% and 76% for H37Rv + Pb18 and Rv40 + Pb18, respectively, improving the antibiofilm activity of 3'chalcona free by up to 50%. In addition, all nanoemulsions presented higher antibiofilm activity than rifampicin, a drug used as a treatment control. Therefore, all nanoemulsions presented very promising results; it is noteworthy that the SNL + 3'chalcona nanoemulsion presented the best antibiofilm results in all situations and could become a possible drug prototype for the treatment of this coinfection.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, Coinfection, Mixed Biofilm, chalcone and Nanoemulsion.