

Maysa Yoshino Rosinha

**Desenvolvimento de protótipos antifúngicos contra biofilmes de
*Histoplasma capsulatum***

Araraquara

2013

Maysa Yoshino Rosinha

**Desenvolvimento de protótipos antifúngicos contra biofilmes de
*Histoplasma capsulatum***

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. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Marisa Fusco
Almeida.

Araraquara
2013

DEDICATÓRIA

O trabalho desenvolvido foi resultado da participação de muitas pessoas que andaram ao meu lado em uma caminhada puxada, mas deliciosa. À frente de todas elas estão meus pais, Ciro e Alice, que sempre fizeram tudo que estava ao seu alcance para que eu pudesse concluir meus estudos, e conseqüentemente este trabalho. Pelo amor e esforço incondicional, dedico a eles. Mas também às minhas queridas irmãs, Marília e Mônica, que junto deles, formam o meu bem mais precioso: minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço minha família, por estar presente do início ao fim, vivendo cada conquista, decepção, dúvidas, não apenas durante o trabalho, mas por toda a vida.

Aos amigos, desde aqueles com quem convivi apenas nas aulas, pela convivência durante esses quase cinco anos, até os amigos de todas as horas. Aqueles que se tornaram também uma família e que fizeram toda a diferença nesses anos e que ainda farão em todos os que estão por vir!

Ao meu namorado, Paulo, pelo companheirismo, paciência e carinho em todos os momentos.

À toda a Família Micologia, por todos os ensinamentos, toda a experiência e por terem feito parte diretamente na concretização deste trabalho; por todos os momentos e por terem me recebido durante um ano e meio como um membro dessa família!

À minha orientadora, Ana Marisa, por ter me dado a oportunidade de conhecer de perto as responsabilidades, experiência e alegrias de desenvolver um trabalho dentro do Laboratório de Micologia Clínica.

RESUMO

A histoplasmose é uma doença respiratória e sistêmica causada pelo fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum*. A micose é endêmica em diversos locais do mundo, incluindo o Rio de Janeiro. Já se sabe que a gravidade de doenças, principalmente das que são causadas por agentes oportunistas, depende principalmente do estado imunológico do paciente. O mesmo se aplica à histoplasmose. Porém, nos últimos anos, tem sido estudada a influência da capacidade de formação de biofilme por esses agentes no desenvolvimento da doença e manifestações das mesmas. Diversos fungos apresentam a habilidade de formar biofilmes e recentemente descobriu-se que o *H. capsulatum* também possui tal habilidade. Embora a relação dos quadros clínicos de histoplasmose e a formação de biofilme por seu agente ainda não esteja completamente esclarecida, tal habilidade pode estar relacionada à sua defesa contra o sistema imunológico e ao agravamento da doença. Este fato, atrelado à escassez de opções terapêuticas antifúngicas, deixam claro a necessidade de busca por novas substâncias que sejam capazes de inibir os fungos e também que sejam capazes de destruir seus biofilmes ou inibir sua formação. Neste aspecto destacam-se as substâncias de origem vegetal, que já têm sido amplamente estudadas e cuja atividade já foi comprovada. Entre elas estão os compostos fenólicos, presentes em diversas espécies vegetais e que têm como exemplo o ácido protocatecuico, os ésteres, derivados deste e também o ácido cafeico e seus derivados. O estudo em questão teve como objetivo investigar a atividade de tais compostos sobre o *H. capsulatum* em sua forma leveduriforme livre e em biofilme, através da realização de testes de sensibilidade com diferentes concentrações dos extratos, monitorados e revelados por agentes colorimétricos, como o *alarBlue*® e o sal tetrazólio, XTT. Através da leitura visual e por valores de absorção por espectrofotometria, observou-se que o protocatecuato de nonila é capaz de inibir a atividade antibiofilme de *H. capsulatum* e outros, assim como o ácido cafeico e alguns de seus derivados, foram capazes de inibir o fungo em sua forma planctônica.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do ácido cafeico	22
Figura 2 - Estrutura química dos protocatecuatos	23
Figura 3 - Curva de crescimento	32
Figura 4 - Plaqueamento – UFC (em log 10)/ mL, em diferentes tempos	33
Figura 5 - Placas utilizadas na contagem de UFC/mL	33
Figura 6 - Leitura das CIM dos protocatecuatos para a levedura livre da cepa EH-331	35
Figura 7 – Análise da viabilidade celular fúngica utilizando o kit Live/Dead®, nas CIM e concentrações inferiores dos protocatecuatos	37
Figura 8 - CIM da proto-nonila para biofilme em formação	38
Figura 9 - Concentrações do extrato x % de XTT – Biofilme em formação	39
Figura 10 - CIM da proto-nonila para biofilme formado	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de CIM do ácido cafeico e derivados para levedura planctônica	34
Tabela 2 - Valores de CIM visuais dos protocatecuatos para levedura planctônica	35
Tabela 3 - CIM, CIM ₉₀ , CIM ₈₀ e CIM ₅₀ dos protocatecuatos para biofilme em formação	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	porcentagem
®	marca registrada
°C	grau celsius
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrometro
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CD4	<i>cluster of differentiation 4</i>
CI ₅₀	concentração Inibitória para 50% de células
CIM	concentração inibitória mínima
CIM ₅₀	concentração que leva à redução em 50% de atividade/crescimento
CIM ₈₀	concentração que leva à redução em 80% de atividade/crescimento
CIM ₉₀	concentração que leva à redução em 90% de atividade/crescimento
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
HIV	Vírus da Imunodeficiência humana
Hsp90	proteína 90 de choque térmico
IS	índice de seletividade
ml	mililitro
mm ³	milímetro cúbico
nm	nanometro

PBS	salina tamponada com fosfato
pH	potencial hidrogênico
rpm	rotações por minuto
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
TNF - α	fator de necrose tumoral alfa
UFC	unidade formadora de colônia

Sumário

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	24
2.1. Objetivos gerais	24
2.2. Objetivos específicos	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Microrganismos e condições de cultivo	24
3.2. Curva de crescimento	25
3.3. Substâncias vegetais:	25
3.3.1. Diluição dos extratos vegetais	26
3.4. Testes de sensibilidade	26
3.4.1. Teste de sensibilidade da levedura na forma planctônica	26
3.4.2. Teste de sensibilidade da levedura na forma de biofilme	28
3.5. Citotoxicidade das substâncias naturais	29
3.6. Testes estatísticos	30
4. RESULTADOS	31
4.1. Curva de crescimento	31
4.2. Sensibilidade da levedura planctônica frente aos antifúngicos sintéticos	34
4.3. Sensibilidade da levedura planctônica frente aos extratos vegetais	34
4.4. Sensibilidade da levedura em biofilme frente aos extratos vegetais	37
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÃO	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1. INTRODUÇÃO

A histoplasmose, doença respiratória e sistêmica, foi descrita inicialmente entre 1904 e 1906 no Panamá, por Samuel Taylor Darling, que julgou que esta era causada por um protozoário capsulado, denominando-o *Histoplasma capsulatum*. (FERREIRA; BORGES, 2009). Somente em 1912 o patologista brasileiro Henrique da Rocha Lima classificou entre os fungos tal agente, que em 1949 foi isolado no ambiente, pela primeira vez, por Emmons et al. (PEDROZA, 2003).

Atualmente sabe-se que o agente etiológico da histoplasmose, *Histoplasma capsulatum* é um fungo dimórfico, que apresenta uma fase parasitária, correspondente à forma leveduriforme, e uma fase saprofítica, correspondente à sua forma miceliar (MARESCA; KOBAYASHI, 1989).

Existem três diferentes variedades dentro da espécie *H. capsulatum*: *H. capsulatum* var. *capsulatum*, *H. capsulatum* var. *duboisii* e *H. capsulatum* var. *farciminosum*, sendo que cada uma demonstra manifestações e distribuições geográficas diferentes (MUÑOS et al., 2010).

A histoplasmose é endêmica no mundo todo, mas há regiões de maiores incidências ou infecções, como ao longo dos rios Mississipi e Ohio, nos Estados Unidos e também no Brasil, especialmente no Rio de Janeiro (NOSANCHUK; GACSER, 2008). A forma epidêmica da doença tem grande impacto em países latino-americanos (GONZÁLEZ; TAYLOR; QUESADA, 2011), sendo registrados casos em todos os estados do México. (LEÓN et al., 2011). Isso se deve ao grande número de trabalhadores rurais, que podem desenvolver a forma epidêmica por atividade ocupacional (GONZÁLEZ; TAYLOR; QUESADA, 2011). Também há relatos de casos na África, local onde se limita a presença da variedade *duboisii* (FERREIRA; BORGES, 2009). A variedade *farciminosum* infecta apenas equinos (MUÑOZ et al., 2010).

H. capsulatum é encontrado mais comumente na natureza, em solos ricos em nitrogênio (NOSANCHUK et al., 2012) e outras áreas contendo fezes de aves e morcegos como cavernas,

minas, túneis ou ainda parques, pomares, casas abandonadas, entre outros. O material orgânico encontrado nestes locais, sob condições ideais de umidade e temperatura, estabelece o nicho ecológico para a fase miceliar de seu desenvolvimento. (MUÑOZ et al., 2010).

A forma miceliar pode ainda ser obtida em laboratório, em cultivo em temperatura ambiente (cerca de 25°C), apresentando hifas hialinas, ramificadas, septadas. Seu tamanho varia de 2 a 4µm de diâmetro e produzem dois tipos de estruturas de reprodução assexuada: macroconídeos e microconídeos. Os macroconídeos são esféricos, podem ter de 8 a 15 µm de diâmetro, com paredes espessas e birrefringentes, cobertas por projeções espiculadas. Os microconídeos são piriformes, podem ter de 2 a 5 µm de diâmetro, com as paredes lisas. (FERREIRA; BORGES, 2009; PEDROZA, 2003).

Devido à sua pequena dimensão, os microconídeos são preferencialmente os responsáveis pela infecção no hospedeiro, onde podem ser rapidamente convertidos à fase leveduriforme. As leveduras são ovaladas, podem ter de 3 a 5µm de diâmetro e apresentar gemulação única. São as formas que podem ser visualizadas no interior de macrófagos e outras células em tecidos infectados. (FERREIRA; BORGES, 2009). Podem, assim como a fase miceliar, ser cultivadas em laboratório, a 37°C e em meios adequados.

A infecção pelo *H. capsulatum* depende de uma interação dinâmica entre as imunidades inata e adaptativa do hospedeiro e fatores de virulência fúngicos (NOSANCHUK; GACSER, 2008). O primeiro passo para desencadear a infecção é a inalação dos microconídeos ou fragmentos de hifas, presentes nos solos e demais locais do ambiente onde o fungo se estabelece. Os conídeos inalados chegam às vias aéreas inferiores e atingem alvéolos e bronquíolos terminais, desencadeando uma resposta inflamatória, caracterizada pela presença de células mononucleares e macrófagos (FERREIRA; BORGES, 2009; NEWMAN; LEMEN; SMULIAN, 2011; SIZEMORE, 2013).

Os macrófagos presentes nestes locais rapidamente fagocitam os microconídeos. A interação conídeo- macrófago é um fenômeno complexo e um componente crítico da resposta do hospedeiro à infecção fúngica (NOSANCHUK et al., 2012). Nesta relação, uma série de eventos são desencadeados, o parasita pode ser destruído ou sobreviver no interior destas células, através da expressão de diferentes tipos de moléculas. O hospedeiro pode expressar moléculas envolvidas no mecanismo de combate ao invasor, como a produção de espécies reativas de oxigênio e produtos da óxido nítrico sintase (GONZÁLEZ; TAYLOR; QUESADA, 2011; NOSANCHUK et al., 2012). O invasor, por sua vez, pode expressar moléculas relacionadas às estratégias de evitar a defesa do outro (GONZÁLEZ; TAYLOR; QUESADA, 2011).

Atualmente, sabe-se que a conversão dos conídeos à fase leveduriforme se deve à mudança de temperatura no organismo hospedeiro. E embora a maioria dos estudos afirme que essa conversão ocorra somente no interior dos macrófagos pela sua temperatura mais alta, alguns autores acreditam que isso também pode acontecer antes mesmo da ingestão pelos macrófagos (GUIMARÃES; NOSANCHUK; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, 2006; SIZEMORE, 2013;). Newman, Lemen e Smulian (2011) observaram que o ambiente interno do macrófago não é mais permissivo ou restritivo a essa transformação do *H. capsulatum*, quando comparada com a que ocorre em meio de cultura de tecido. Já a capacidade de conversão dos conídeos no interior de células dendríticas é extremamente limitada, comparada à que ocorre no interior dos macrófagos. Gauthier e Klein (2008) afirmam que a transição entre as duas fases que ocorre nos fungos dimórficos é crucial para a patogênese. E ainda que, além da temperatura, outros fatores regulam essa transição, como o estresse oxidativo e a tensão de dióxido de carbono (GAUTHIER; KLEIN, 2013). No interior dos macrófagos, as leveduras se multiplicam, os destroem e podem então ser fagocitadas novamente por outros macrófagos residentes, neutrófilos e demais células recrutadas ao local (NEWMAN; LEMEN; SMULIAN, 2011).

As manifestações clínicas e a gravidade da histoplasmose dependem da magnitude da exposição ao agente e da resposta imune do hospedeiro. Na maioria dos casos, a infecção é assintomática ou limita-se a sintomas leves e inespecíficos (KAUFFMAN, 2009). Uma infecção pulmonar grave pode ser desencadeada, mesmo em indivíduos imunocompetentes, em casos de exposição a grandes quantidades de conídios. Isto ocorre principalmente em explorações e remoção de excrementos de pássaros e morcegos em cavernas; em galinheiros e poleiros de aves (KAUFFMAN, 2009; VIDYANATH et al., 2013).

A doença pode ocorrer em sua forma pulmonar aguda; pulmonar crônica e ainda atingir a forma disseminada (VIDYANATH et al., 2013). A pulmonar crônica é encontrada em pacientes com pneumopatia crônica prévia (PONTES, 2008). A disseminada ocorre quando, dos pulmões, leveduras viáveis chegam aos linfonodos e, pela corrente sanguínea, atingem diferentes órgãos (NOSANCHUK et al., 2012).

Hospedeiros imunocomprometidos podem desenvolver a infecção grave pulmonar, que pode ainda progredir para a forma disseminada da doença, mesmo na presença de pequenas quantidades de conídeos (KAUFFMAN, 2009). Em sua forma disseminada, a histoplasmose pode afetar órgãos de diversos sistemas, como sistema gastrointestinal; sistema nervoso central; articulações; medula óssea; septo nasal; cavidade bucal, podendo incluir língua, palato, mucosa bucal, gengiva e faringe; pele e em alguns casos pode haver o comprometimento dos rins (VIDYANATH, et al., 2013; YANG et al., 2013).

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) tem grande destaque entre os fatores que desencadeiam a imunossupressão. Sendo assim, desempenha papel importante no desenvolvimento dos casos de histoplasmose. Estudos demonstraram que 95% dos pacientes portadores do vírus HIV e com histoplasmose apresentam a forma disseminada desta doença (VIDYANATH et al., 2013). Nesta situação, a histoplasmose é responsável por altas taxas de mortalidade e muitas vezes é diagnosticada como tuberculose ou pneumocistose (BRILHANTE

et al., 2012). Brilhante e colaboradores (2012) realizaram um estudo com pacientes HIV positivo no Ceará, estado endêmico para a histoplasmose, de 2006 a 2010. Observou-se que a micose foi considerada a primeira manifestação da SIDA em 38,9% dos casos e que 85,8% dos pacientes apresentavam menos de 100 células T-CD4 por mm³ de sangue, o que confirma que a imunossupressão é um dos fatores mais importantes e influentes nas manifestações clínicas da histoplasmose (BRILHANTE et al., 2012).

Além da SIDA, outros fatores que contribuem para o desenvolvimento da histoplasmose disseminada são: o uso de corticosteroides e outros agentes imunossupressores; doenças hematológicas e pacientes que receberam órgãos sólidos de transplantes. O uso de antagonistas do fator de necrose tumoral (TNF- α) é atualmente um importante fator no desenvolvimento da doença (KAUFFMAN, 2009).

Pacientes com imunossupressão avançada, além da possibilidade de desenvolver a doença pela forma já descrita (pela infecção primária), podem ainda, em áreas endêmicas, desenvolver a histoplasmose por reinfecção, isto é, possuindo uma infecção latente e após inalação de conídios novamente, voltam a apresentar a doença. Ou ainda por reativação, quando, após uma infecção latente, a diminuição da imunidade celular do paciente provoca a reativação da doença (PONTES, 2008). A reativação pode ocorrer anos após a exposição inicial e em regiões não endêmicas de histoplasmose, o que dificulta o diagnóstico da doença (KAUFFMAN, 2009).

Entre os diversos fatores de virulência que o *H. capsulatum* apresenta, estão: a expressão de vários genes específicos da fase leveduriforme, em resposta a altas temperaturas e outras condições adversas; genes relacionados à transição de fases do desenvolvimento e a presença de uma estrutura polissacarídica complexa na parede celular, composta por galactomananas β -1,3 glucano e α -1,3 glucano. Esta tem sido relatada como fator diretamente ligado à virulência das cepas. (RIBEIRO, 2012).

Dentre os fatores que podem agravar o quadro clínico de infecções fúngicas, destaca-se a capacidade do microrganismo de formar biofilme. Os biofilmes podem ser descritos como comunidades altamente estruturadas de microrganismos que estão associados a uma superfície, e/ou ligados um ao outro, fechados dentro de uma matriz extracelular protetora e autoproduzida (COSTERTON et al., 1995). Biofilmes podem estar aderidos a superfícies bióticas ou abióticas.

Atualmente, já é bem estabelecido que o biofilme é a forma predominante de crescimento de microrganismos na natureza (PIERCE et al., 2013). Estimativas sugerem que até 80% dos microrganismos livres no meio ambiente também se organizam em comunidades de biofilme (RAMAGE et al., 2012). A sua fixação inicial em uma superfície é influenciada por diversos fatores. Entre eles, o fluxo do meio no local da infecção (urina, sangue, saliva, muco); pH; temperatura; osmolaridade; imunidade do hospedeiro e a presença de bactérias e antimicrobianos. Estes apresentam fases de desenvolvimento descritas através de modelos já estabelecidos e incluem: encontro de substrato apropriado, adesão, colonização, produção de matriz extracelular, maturação do biofilme formado e dispersão (RAMAGE et al., 2012).

Costerton foi o primeiro a avançar na ideia de que algumas infecções seriam especificamente mediadas por microrganismos em forma de biofilme e diferentes das infecções mediadas pelo microrganismo em sua forma planctônica e unicelular. (HALL-STOODLEY et al., 2012). As células organizadas na disposição de biofilme, em relação às células livres, apresentam diferenças estruturais, funcionais e comportamentais, sendo comparadas com uma estrutura multicelular e apresentando nível de organização superior à forma livre (HALL-STOODLEY et al., 2012). Proteção contra o ambiente; resistência a estresses físico e químico e cooperação metabólica também são fornecidas ao organismo no biofilme (RAMAGE et al., 2012).

Hoje há relatos de diversos fungos capazes de formar biofilme, como *Candida spp.*; *Aspergillus spp.*; *Trichosporon spp.*; *Cryptococcus neoformans*; *Blastoschizomyces capitatus*;

Malassezia pachydermatis; *Saccharomyces cerevisiae*, *Coccidioides immitis*, entre outros (RAMAGE et al., 2009). Pitangui e colaboradores (2012) relataram que o *H. capsulatum* também apresenta esta habilidade. A investigação da formação de biofilme de fungos tem sido facilitada através do desenvolvimento e adaptações de metodologias consideradas relativamente simples, destacando-se metodologias desenvolvidas para pesquisa de biofilmes de *Candida spp* (PIERCE et al., 2010).

Através das técnicas atualmente desenvolvidas para a pesquisa da formação dos biofilmes, é possível também realizar testes de sensibilidade frente a antimicrobianos. Há metodologias que permitem a monitoração dos biofilmes nesta situação, e neste ponto destacam-se os ensaios colorimétricos. Os mais comumente utilizados são os ensaios de redução de sais de tetrazólio. Nestes se incluem o ensaio com MTT, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 - difeniltetrazolium bromidíio e o ensaio com XTT, 2,3 - bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) - 5 - (fenilaminocarbonil-tetrazolium). O MTT, ao ser reduzido, principalmente por ação de enzimas desidrogenases de células viáveis, é convertido a cristais de formazana, que apresentam coloração púrpura e podem ser quantificados por espectrofotometria de absorção a 540 nm (OLIVEIRA, 2010). O XTT também é convertido a uma formazana colorida por ação de enzimas, incluindo a succinoxidase mitocondrial e as do complexo Citocromo P450 (KUHN et al., 2003). O produto da redução do XTT apresenta coloração alaranjada e pode ser quantificado por espectrofotometria de absorção a 490 nm (KUHN et al., 2003; OLIVEIRA, 2010). A leitura da reação com XTT e MTT pode ainda ser visual, e a coloração e intensidade desta refletem a viabilidade das células em análise.

Os cristais de formazana produzidos na redução do MTT são pouco solúveis em água, por isso requerem a adição de solventes orgânicos para sua extração e dissolução (OLIVEIRA, 2010). O produto da reação com o XTT é solúvel em água, o que é de extrema importância na pesquisa de biofilmes, visto que permite análise da viabilidade das células apenas utilizando o

sobrenadante, sem alterar o biofilme, que permanece intacto (KUHN et al., 2003). As reações utilizando XTT ou MTT geralmente são associadas a um transportador de elétrons artificiais, como a menadiona e o metassulfato de fenazina, a fim de facilitar a reação (OLIVEIRA, 2010).

Outro ensaio comumente utilizado com o objetivo de avaliar a viabilidade celular envolve o reagente *alamarBlue*®. O ensaio baseia-se no uso de um indicador fluorogênico, resazurina, que inicialmente, em sua forma não fluorescente, apresenta coloração azul. Esta, ao ser reduzida, passa a ser altamente fluorescente e apresentar a coloração rosa, correspondendo à forma denominada resorufina. Ainda não é completamente esclarecido se essa redução ocorre intracelularmente, por atividade enzimática ou por uma reação química do meio. Mas acredita-se que está relacionada ao consumo de oxigênio no metabolismo da célula em atividade (O'BRIAN et al, 2000). A amplitude desta reação, portanto, é um reflexo da viabilidade celular e pode ser quantificada por sua densidade óptica (NAKAYAMA et al., 1997).

Podem ser utilizados ainda, na investigação de viabilidade celular, fluorocromos capazes de marcar componentes celulares específicos (OLIVEIRA, 2010). O kit *Live/Dead*® (*Molecular Probes*®, *Life Technologies*) utiliza os reagentes SYTO9 e iodeto de propídeo, que se ligam ao DNA. O SYTO9, sozinho, cora tanto as células apresentando membrana intacta quanto as que apresentam membrana danificada. Já o iodeto de propídeo penetra apenas naquelas de membrana danificada. Assim, o iodeto de propídeo, junto com o SYTO9, é capaz de provocar a redução deste, resultando na coloração vermelha, diferenciando as células viáveis das não viáveis. (FARIA, 2012).

As diferentes propriedades apresentadas pelas células em biofilme, em comparação às células em sua forma livre, desencadeiam dois fatores de extrema importância clínica. O primeiro é a ocorrência de infecções crônicas ou recorrentes, pois o biofilme atua como um reservatório do microrganismo, tornando-o capaz de persistir no hospedeiro. O segundo é a

maior tolerância e resistência aos antifúngicos e antimicrobianos (HALL-STOODLEY et al., 2012), tais como os azóis e polienos (RAMAGE et al., 2001).

A resistência a antifúngicos apresentadas pelas células no biofilme é um fenômeno complexo e multifatorial. Ao contrário das células fúngicas planctônicas livres, os biofilmes não requerem alterações genéticas irreversíveis para manter um fenótipo resistente. Os principais fatores relacionados à resistência dos biofilmes são: as condições metabólica e fisiológica das células, que são também um reflexo das condições de pH, temperatura e disponibilidade de oxigênio que o biofilme se encontra; o alto número de células, relevante devido à comunicação e cooperação entre elas; a superexpressão de alvos de antifúngicos, como as mutações no gene *Erg 11*, que conferem resistência aos azóis; a expressão de genes relacionados à resistência mediada por bombas de efluxo; a matriz extracelular, que fornece proteção contra fatores como a imunidade do hospedeiro e agentes antifúngicos; as células capazes de persistir no hospedeiro, relacionadas à resistência em infecções crônicas e por fim, as respostas a situações de estresse, mediadas principalmente pela *Hsp90*, que regula a resistência a drogas por diferentes mecanismos (RAMAGE et al., 2012).

Em relação ao *H. capsulatum*, a formação de biofilme pelas formas leveduriformes poderia ocasionar o agravamento de quadros de histoplasmose. Segundo Pitangui e colaboradores (2012) a formação do biofilme poderia ainda, ter relação com a capacidade de evitar a defesa pelas células do sistema imune do hospedeiro, visto que as leveduras encontram-se agrupadas, contrastando com as leveduras na forma planctônica, mais facilmente eliminadas pelas células de defesa.

O arsenal terapêutico contra infecções fúngicas atualmente disponível é escasso. A composição da célula fúngica é muito semelhante à da célula humana, e por conta disso, existem poucos fármacos seletivos à célula fúngica, o que explica a elevada toxicidade da terapia antifúngica. As três classes principalmente utilizadas no tratamento de micoses invasivas são:

azóis, polienos e equinocandinas. E embora eficazes, apresentam deficiências significativas nos tratamentos. A anfotericina B, da classe dos polienos, é considerada padrão ouro no tratamento de diversas infecções, entretanto, apresenta alta toxicidade intrínseca, especialmente nefrotóxica. As equinocandinas, embora apresentem altos níveis de segurança e tenham sido recentemente introduzidas às terapias, já são observadas em casos de resistência fúngica, assim como os azóis (PIERCE et al., 2013).

A resistência e toxicidade, já preocupantes nas infecções fúngicas, requerem atenção ainda maior quando são causadas por fungos organizados em biofilmes, devido às propriedades já citadas, como capacidade de permanência no hospedeiro e a resistência multifatorial. Provas disso são: o aumento no número de casos de endocardite, causados pela presença de *Candida* spp em dispositivos intravasculares; os estudos que evidenciam a presença de biofilmes em superfícies bióticas e as altas taxas de morbidade e mortalidade, relacionadas ao uso de dispositivos médicos, como cateteres, visto que 90% dessas infecções estão relacionadas a biofilmes de microrganismos (SARDI et al., 2013). Dessa forma, fica clara a extrema necessidade de buscas por novas substâncias antifúngicas, acompanhando as informações que têm surgido nos últimos anos. Neste aspecto, as substâncias naturais ganham lugar de destaque, pela acessibilidade a elas, vasta diversidade e a possibilidade de utilização das mesmas como agentes terapêuticos, fontes de matéria-prima ou como protótipos para novos modelos farmacológicos (SOARES, 2011).

Há muito tempo as plantas são utilizadas na medicina, no tratamento de diferentes patologias (CALIXTO, 2000). São utilizadas principalmente na medicina popular, por representar uma alternativa econômica e de fácil acesso (SARDI; ALMEIDA; MENDES GIANNINI, 2011). Ainda hoje, são uma importante fonte de novas substâncias bioativas e alvo de interesse econômico de prospecção para a descoberta de novas drogas. Estima-se que 25%

dos medicamentos atualmente produzidos são derivados, direta ou indiretamente a partir de plantas medicinais (BRANDÃO et al., 2013).

As Américas Central e do Sul são extremamente ricas em biodiversidade. Diversas espécies vegetais deram origem a importantes substâncias no tratamento de diferentes patologias. Da casca da peruana *Cinchona* spp, da família Rubiaceae originou-se o antimalárico quinino. Das folhas da brasileira *Pilocarpus* spp, da família Rutaceae originou-se a pilocarpina, usada no tratamento de glaucoma, entre outros exemplos. O Brasil destaca-se como um dos países mais ricos do mundo, apresentando mais de 40 mil espécies vegetais diferentes, que representam 20% da flora mundial (BRANDÃO et al., 2013).

Nos últimos anos tem aumentado o interesse em espécies vegetais com a finalidade de descoberta de substâncias que tenham ação antimicrobiana e antifúngica. Já são conhecidas diferentes espécies com essa atividade: *Mentha piperita*, *Rosmarinus officinalis*, *Arrabidaea chica*, *Tabebuia avellanedae*, *Punica granatum*, *Syzygium cumini* (HÖFLING et al., 2010), *Mallotus philippinensis* (KULKARNIA et al., 2013), *Maytenus ilicifolia* (GULLO et al., 2012), entre outras. Alguns extratos e óleos essenciais de plantas com ação antifúngica foram estudados por diversos pesquisadores, e embora seus componentes sejam pouco conhecidos, acredita-se que a presença de flavonoides e terpenos e certo grau de lipofilicidade sejam responsáveis pela ação tóxica sobre a membrana da célula fúngica (SARDI; ALMEIDA; MENDES GIANNINI, 2011).

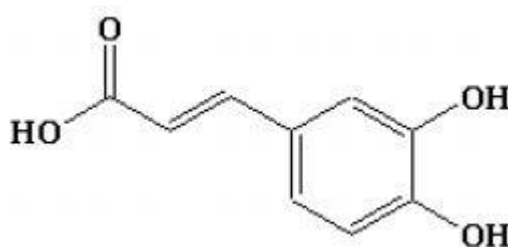
Trabalhos focados em substâncias naturais e o desenvolvimento de antifúngicos a partir destas, têm sido desenvolvido no Laboratório de Micologia Clínica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da UNESP, no Campus de Araraquara. Os trabalhos são desenvolvidos com apoio dos programas da FAPESP (Biota-FAPESP e Bioprospecta) e SISBIOTA – CNPq, e já apresentam resultados que demonstram a eficácia de substâncias vegetais sobre diferentes

fungos. Dentre as substâncias fornecidas aos trabalhos no laboratório, estão o ácido protocatecuico, ácido cafeico e alguns de seus derivados.

O ácido cafeico é um derivado do ácido cinâmico e assim como diversos compostos fenólicos, apresenta atividade antioxidante. A mesma atividade é observada em seus derivados, alquil ésteres (HRÁDKOVÁ et al., 2013). Estudos demonstraram ainda que o ácido cafeico está relacionado à atividade anticancerígena (TAIRA et al., 2013);

O ácido cafeico pode ser encontrado em diversas espécies vegetais, como nas folhas de batata doce (*Ipomoea batatas* L.) (TAIRA et al., 2013); na batata Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) (PARK; HAN, 2013) e na erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), que apresenta atividade antimicrobiana (PRADO MARTIN et al., 2013). O própolis, que também apresenta o ácido cafeico em sua composição, demonstrou atividade antimicrobiana, e outras ações farmacológicas, como citostáticas, hepato-proteção, atividade antioxidante e antiinflamatória. (BARRIENTOS et al., 2013). Na figura 1 observamos a estrutura química do ácido cafeico.

Figura 1 - Estrutura química do ácido cafeico



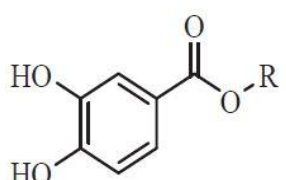
Adaptado de Taira et al., 2013

O ácido protocatecuico, assim como o ácido cafeico, é um ácido diidróxifenólico: ácido 3,4 diidróxibenzóico (HRÁDKOVÁ et al., 2013; LIN et al., 2009). Sua presença foi relatada em diversas espécies 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 e erva-cidreira) (KWON; VATTEM; SHETTY, 2006), *Eucommia ulmoides* (LIN et al., 2009). Embora a principal atividade apresentada pelo ácido protocatecuico seja a ação antioxidante, estudos demonstraram relação deste com a diabetes mellitus tipo 2 e hiperglicemia pós prandial, por sua capacidade de inibição das α - glucosidades, responsáveis pela degradação de polissacarídeos (KWON; VATTEM; SHETTY, 2006) . E ainda, atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Helicobacter pylori* do estômago de camundongos (LIU; HSU; YIN, 2008).

Através de reações de esterificação do ácido protocatecuico é possível obter os ésteres de ácido protocatecuico, ou protocatecuatos. Por estas reações é possível obter compostos que apresentam melhor solubilidade em meios apolares, pelo aumento da lipofilicidade (REIS et al., 2010). Recentemente foi demonstrada atividade destes derivados contra espécies de dermatófitos (SOARES, 2011). A introdução de grupos alquil ao grupo carboxílico do ácido produz radicais de tamanhos variados, originando diferentes protocatecuatos (REIS et al., 2010). A diferença de atividades entre estes parece estar relacionada às suas diferentes cadeias carbônicas (Figura 2).

Figura 2 - Estrutura química dos protocatecuatos

	1	Ácido protocatecuico	R = H
	2	Protocatecuato de metila	R = CH ₃
	3	Protocatecuato de etila	R = CH ₂ CH ₃
	4	Protocatecuato de propila	R = (CH ₂) ₂ CH ₃
	5	Protocatecuato de butila	R = (CH ₂) ₃ CH ₃
	6	Protocatecuato de pentila	R = (CH ₂) ₄ CH ₃
	7	Protocatecuato de hexila	R = (CH ₂) ₅ CH ₃
	8	Protocatecuato de heptila	R = (CH ₂) ₆ CH ₃
	9	Protocatecuato de octila	R = (CH ₂) ₇ CH ₃
	10	Protocatecuato de nonila	R = (CH ₂) ₈ CH ₃
	11	Protocatecuato de decila	R = (CH ₂) ₉ CH ₃
	12	Protocatecuato de dodecila	R = (CH ₂) ₁₁ CH ₃
	13	Protocatecuato de tetradecila	R = (CH ₂) ₁₃ CH ₃
	14	Protocatecuato de hexadecila	R = (CH ₂) ₁₅ CH ₃
	15	Protocatecuato de octadecila	R = (CH ₂) ₁₇ CH ₃

Adaptado de Soares et al., 2011

2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivos gerais*

Verificar, através de testes de sensibilidade, atividade antifúngica de substâncias naturais sobre o *H. capsulatum* em sua forma de biofilme.

2.2. *Objetivos específicos*

-Verificar o desenvolvimento do *H. capsulatum* em diferentes meios de cultura e diferentes tempos, construindo curvas de crescimento;

-Padronizar o teste de sensibilidade do *H. capsulatum*, em sua forma leveduriforme livre, frente à ação de drogas sintéticas, através de modificações no procedimento descrito por de Paula e Silva et al. (2013) e no documento M27-A3 do CLSI;

-Realizar a prospecção de extratos vegetais quanto à atividade antifúngica contra o *H. capsulatum* em sua forma leveduriforme livre e em sua forma de biofilme, baseando-se nos modelos de de Paula e Silva et al. (2013) e o procedimento descrito por Pierce et al. (2010), respectivamente.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. *Microrganismos e condições de cultivo*

Para realização dos experimentos, foram utilizadas as cepas de *H. capsulatum* var. *capsulatum*: EH-331, também denominada G-186B, originalmente isolada de um organismo humano, no Panamá; EH-335, também denominada G-217B, isolada de um organismo humano, nos Estados Unidos e a cepa EH-315, denominada M-168I, de alta virulência, de origem mexicana e isolada do intestino de morcego.

As cepas foram disponibilizadas pelo Laboratório de Micologia Clínica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, onde foi realizado todo o estudo. Os microrganismos

foram fornecidos inicialmente ao laboratório, para realização de estudos anteriores, pelo Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Faculdade de Medicina da Universidade Nacional Autônoma do México (UNAM). As cepas foram mantidas em sua forma de levedura em meio BHI caldo, suplementado com 1% de glicose e 0,1% de L-cisteína a 37°C.

3.2. Curva de crescimento

A curva de crescimento foi realizada com o intuito de observar o comportamento do *H. capsulatum* em diferentes meios de cultura e tempos de incubação. A partir da curva é possível verificar quais são as condições mais adequadas para realização de diferentes ensaios envolvendo o fungo, incluindo os testes de sensibilidade em sua forma livre e em biofilme.

Para construção da curva de crescimento, foram preparados meios de cultura em caldo: meio BHI caldo suplementado com 1% de glicose e 0,1% de L-cisteína; meio RPMI-1640 suplementado com 2% de glicose; meio RPMI-1640 suplementado com 2% de glicose e 0,1% de cisteína. Os meios foram utilizados para observação do desenvolvimento do fungo em cada um deles, em diferentes tempos. As condições de incubação e preparo do inóculo seguiram o item 3.4.1, substituindo apenas o meio RPMI-1640 pelos meios citados e alterando o tempo de incubação. Além disso, foram preparados inóculos de $2,5 \times 10^3$ e $2,5 \times 10^4$ células/mL.

Os tempos de incubação analisados foram: 0; 1 hora; 2 horas; 5 horas; 8 horas; 12 horas; 24 horas; 36 horas e 48 horas. Em cada tempo, foi realizada a leitura por espectrofotometria de absorção a 490 nm e plaqueamento de cada poço da placa de 96 poços, para contagem de UFC. Para isto, foram preparadas placas de Petri contendo o meio de cultura BHI ágar suplementado com 1% de glicose e 0,1% de L-cisteína. Para o plaqueamento, foram retiradas alíquotas de 30µL de cada poço, e realizando também, em PBS estéril, diluições de 1:10; 1:100; 1:1000; 1:5000; 1:10000 e 1:20000.

3.3. Substâncias vegetais:

Diferentes substâncias vegetais foram prospectadas quanto sua ação contra o *H. capsulatum* em sua forma de levedura livre e de biofilme. As substâncias foram extraídas e cedidas por colaboradores do Instituto de Química da UNESP, campus de Araraquara. Foram prospectados o ácido protocatecuico e seus derivados (ésteres de ácido protocatecuico): protocatecuato de etila; propila; butila; hexila; heptila; octila; nonila; decila; dodecila; tetradecila; hexadecila; octadecila. E ainda o ácido cafeico e seus derivados: ácido cafeico metil éster; etil éster; propil éster; pentil éster; hexil éster; decil éster e dodecil éster.

3.3.1. Diluição dos extratos vegetais

Os extratos foram pesados e diluídos em DMSO, em quantidades adequadas para obtenção de soluções mãe de cada extrato, a partir das quais, foram realizadas diluições nos respectivos meios de cultura, obtendo as concentrações testadas em cada ensaio (125µg/mL e 500µg/mL, nos testes da forma planctônica e biofilme, respectivamente).

3.4. Testes de sensibilidade

3.4.1. Teste de sensibilidade da levedura na forma planctônica

Os testes de sensibilidade do fungo em sua forma leveduriforme livre foram realizados de acordo com de Paula e Silva et al. (2013). Foram realizados em microplacas de 96 poços, utilizando inóculo de concentração $2,5 \times 10^3$ leveduras/mL. Esta concentração foi obtida através da diluição de uma suspensão com $5,0 \times 10^6$ leveduras/mL (por contagem em câmara de Neubauer e diluição em PBS) na razão 1:50 em PBS, seguida da diluição na razão 1:20 em meio RPMI-1640 suplementado com 2% de glicose.

As placas foram montadas adicionando 100µL do inóculo e 100µL da substância (extrato vegetal ou droga sintética) em cada poço, correspondente a cada concentração, além dos controles positivos e negativos da reação. O controle positivo corresponde ao poço contendo 100µL do inóculo e 100µL do meio RPMI-1640 suplementado com 2% de glicose, enquanto o controle negativo corresponde ao poço contendo 200 µL do meio RPMI-1640 suplementado com

2% de glicose. Foram incubadas a 37°C, sob agitação de 150 rpm, durante 24 horas. Com intuito de obter revelação visual das placas, foram adicionados 20µL de *alarBlue*® (*Molecular Probes*®, *Life Technologies*) em cada poço.

3.4.1.1. Sensibilidade aos antifúngicos sintéticos

A metodologia descrita no procedimento de de Paula e Silva et al. (2013), baseada no documento M27-A3, do CLSI, foi modificada em alguns parâmetros para a padronização do teste para o fungo *H. capsulatum*.

Os antifúngicos utilizados foram: anfotericina B, itraconazol e voriconazol em concentrações de 16 µg/mL a 0,0313 µg/mL e caspofungina e fluconazol em concentrações de 64 µg/mL a 0,125 µg/mL. As drogas sintéticas foram submetidas a um controle de sua atividade, realizando o teste de sensibilidade com a cepa ATCC 90028 de *Candida albicans* e comparando-se o resultado obtido com a CIM já estabelecida na literatura para a cepa.

Os testes foram realizados em diferentes concentrações: $2,5 \times 10^6$; $2,5 \times 10^5$; $2,5 \times 10^4$ e $2,5 \times 10^3$. Outra modificação em relação à metodologia padrão foi o uso de meio de cultura BHI caldo, suplementado com 0,1% de cisteína e 1% de glicose, no lugar de RPMI-1640. Todos os testes realizados foram feitos em duplicata ou triplicata, e em todos houve adição de 20 µL de *alarBlue*® para revelação visual.

3.4.1.2. Sensibilidade frente à ação dos extratos vegetais

Foi realizada a prospecção do ácido protocatecuico e seus derivados contra as cepas EH-331; EH-335 e EH-315 de *H. capsulatum* e a prospecção do ácido cafeico e derivados contra as cepas EH-331 e EH-315. Os ensaios foram realizados em triplicata e duplicata, respectivamente. Assim como nos testes de sensibilidade frente aos antifúngicos sintéticos, em cada placa foram feitos controles positivo e negativo. Foram também adicionados 20 µL de *alarBlue*® em cada poço, para leitura visual dos resultados, após 24 horas de incubação a 37 °C, sob agitação de 150 rpm.

Os protocatecuatos foram testados nas concentrações de 500 µg/ mL a 0,98 µg/ mL, exceto os protocatecuatos de octila e nonila, que foram testados de 125 µg/ mL a 0,244 µg/ mL. O ácido cafeico e derivados foram testados nas concentrações de 250 µg/ mL a 0,49 µg/ mL. As diluições de extrato seguiram o item 3.3.1.

3.4.1.3. Ensaio de viabilidade fúngica utilizando o kit Live/Dead®

Seguindo o procedimento descrito em 3.4.1.2, de teste de sensibilidade em microdiluição, também foi realizado ensaio de viabilidade fúngica do *H. capsulatum* (cepa EH-331) frente aos protocatecuatos de nonila, decila e dodecila, através do ensaio *Live/Dead*® (*Molecular Probes*®, *Life Technologies*), que utiliza os reagentes iodeto de propídeo e SYTO9. Através das instruções do fabricante e testes anteriormente realizados no laboratório, foram realizadas diluições dos corantes de 1:20 em PBS estéril, em quantidades suficientes para adição de 10µL de cada solução nos poços analisados da placa. Esta foi incubada a 37°C por 15 minutos e em seguida fez-se a leitura no equipamento *In Cell Analyzer 2000* (GE Healthcare).

3.4.2. Teste de sensibilidade da levedura na forma de biofilme

Foram realizados testes de sensibilidade do *H. capsulatum* em sua forma de biofilme formado e também em seu biofilme ainda em formação. A formação do biofilme de *H. capsulatum* foi realizada segundo procedimento de Pitangui et al. (2012). Utilizou-se placa de 96 poços, adicionando 100 µL de inóculo na concentração $5,0 \times 10^6$ em PBS, nos respectivos poços. A placa foi incubada a 37 °C, sob agitação de 100 rpm, durante as 7 horas necessárias para pré adesão.

Após as 7 horas de pré adesão, na placa referente ao teste do biofilme em formação, foram adicionadas 100 µL de cada solução de extrato, em ordem decrescente de concentração e 100 µL de meio BHI caldo suplementado com 1% de glicose e 0,1% de L-cisteína nos poços de

controles. Em seguida, incubou-se a placa a 37 °C em repouso, durante o tempo necessário para ação dos protocatecuatos sobre o fungo, 48 horas.

Na placa referente ao biofilme formado, após as 7 horas, adicionou-se o meio BHI caldo suplementado com 1% de glicose e 0,1% de L-cisteína em todos os poços, retirando o sobrenadante (PBS). Nesta placa, as soluções de extratos foram adicionadas após 72 horas, tempo estabelecido para sua formação completa, seguida da incubação a 37 °C, em repouso, por 48 horas. Dentro deste período, a cada 24 horas trocou-se o meio de cultura (sobrenadante) por novo meio.

Os protocatecuatos foram testados nas concentrações de 500 µg/ mL a 0,98 µg/ mL. As diluições de extrato seguiram o item 3.3.1

3.4.2.1. Monitoramento do biofilme

A leitura colorimétrica do ensaio foi feita seguindo o método descrito por Pierce et al. (2010), que baseia-se na redução do sal tetrazólio, XTT. Após 48 horas de ação dos protocatecuatos sobre o biofilme, foram adicionados em cada poço, 100 µL da solução de XTT e menadiona, utilizada para acelerar a reação de redução. Após período de 3 horas de incubação a 37 °C, em repouso, fez-se a leitura em espectrofotômetro de absorção a 490 nm.

A partir dos dados obtidos na leitura espectrofotométrica, foram calculadas as concentrações inibitórias mínimas CIM₅₀, CIM₈₀ e CIM₉₀, que são as concentrações das substâncias que levam à redução em 50%, 80% e 90%, respectivamente, das leituras colorimétricas, detectadas em comparação com o controle positivo. Este corresponde ao biofilme na ausência da substância prospectada. Os valores podem ser calculados a partir das fórmulas: $x \cdot 50 / 100$ para CIM₅₀; $x \cdot 20 / 100$ para CIM₈₀ e $x \cdot 10 / 100$ para CIM₉₀, sendo “x” a diferença entre os valores de absorbância dos controles positivos e negativos (PIERCE et al., 2010).

3.5. Citotoxicidade das substâncias naturais

Após realizada a prospecção das substâncias naturais, fez-se necessária a realização de testes de citotoxicidade das mesmas, de acordo com a concentração utilizada da substância (CIM). Foi analisada a toxicidade sobre macrófagos alveolares, invadidos inicialmente pelo *H. capsulatum* na infecção. Através dos resultados do ensaio de citotoxicidade (valor de CI_{50}), realizado por Soares (2003) e do valor de CIM_{50} , obtido no presente estudo, pode-se calcular o índice de seletividade (IS) da substância testada. O valor é obtido pela fórmula: $IS = IC_{50} / CIM_{50}$, e sendo maior que 10, indica maior seletividade da substância ao fungo do que para a célula. IS menor que 10 indica maior seletividade à célula do que ao fungo, e consequentemente, citotoxicidade.

3.6. Testes estatísticos

Foi realizada análise de variância Two way Anova com pós teste de Bonferroni no gráfico da curva de crescimento que relaciona a absorbância a 490 nm com os tempos de incubação utilizados. Foram relacionados os crescimentos dos inóculos de $2,5 \times 10^3$ células/mL em BHI e de $2,5 \times 10^3$ células/mL em RPMI, padrão do documento M27-A3, do CLSI. Na análise $P < 0,05$ foi considerado como significante.

4. RESULTADOS

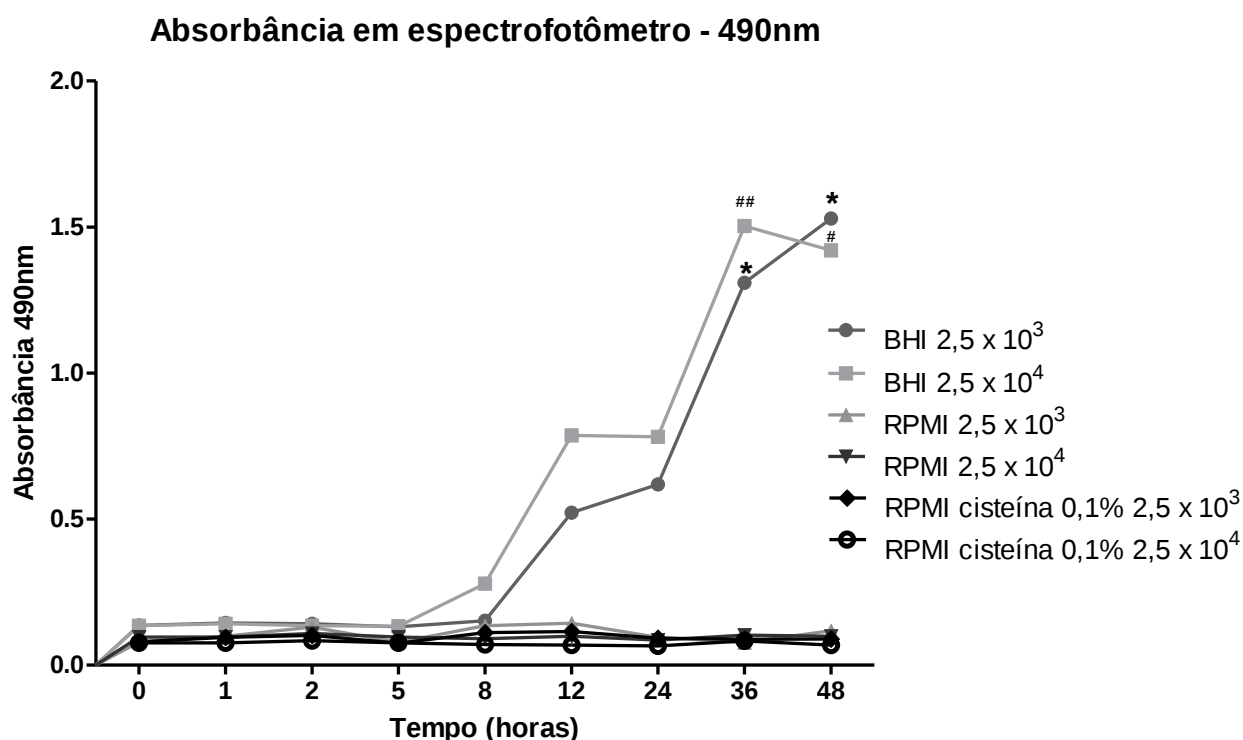
4.1. Curva de crescimento

Foi avaliado o comportamento do *H. capsulatum* em diferentes concentrações de inóculo, durante nove intervalos de tempo e nos meios de cultura BHI e RPMI-1640. Através da leitura de absorbância em espectrofotometria a 490 nm, verificou-se que o meio BHI favorece o crescimento do *H. capsulatum*. Com o intuito de verificar qual a relevância da suplementação do meio com L - cisteína (presente no meio BHI) no crescimento do fungo, esta foi também adicionada ao meio RPMI, já suplementado com glicose. Não foi observado maior crescimento quando comparamos o meio RPMI com e sem L - cisteína.

O objetivo principal da curva de crescimento foi avaliar as melhores condições para realização de ensaios com o *H. capsulatum* e especialmente, para a padronização do teste de sensibilidade frente aos antifúngicos sintéticos. E embora o meio BHI seja mais adequado ao crescimento do fungo e o meio já anteriormente padronizado por Pitangui et al. (2012) na formação do biofilme, seu crescimento não representou uma melhoria no ensaio com os antifúngicos sintéticos.

Através da curva de crescimento, também verificou-se que o *H. capsulatum* pode, em condições favoráveis, apresentar um tempo de vida maior do que 24 horas.

Figura 3 - Curva de crescimento



A figura 3 mostra que, comparando o crescimento de inóculo $2,5 \times 10^3$ no meio BHI com o inóculo $2,5 \times 10^3$ no meio RPMI, padrão do documento M27-A3 do CLSI, não foi observada diferença estatística significativa no tempo de 24 horas, enquanto nos tempos de 36 e 48 horas foi observada diferença estatística e significativa. ($P < 0,05$).

A diferença no desenvolvimento do *H. capsulatum* nas diferentes condições (tempo, meio de cultura e concentração de inóculo) também é observada nos resultados de contagem de UFC/mL, na figura 4. Na figura 5, as placas na parte superior da imagem representam o plaqueamento do conteúdo dos poços referentes ao meio BHI, enquanto as placas da parte inferior representam o plaqueamento do conteúdo dos poços referentes ao meio RPMI. À esquerda de cada uma das imagens estão as placas referentes aos inóculos de $2,5 \times 10^3$, enquanto as da direita são referentes aos inóculos de $2,5 \times 10^4$. As duas imagens correspondem aos tempos

de 2 e 48 horas, respectivamente. As placas do meio BHI e tempo 48 horas correspondem à diluição de 1:20000 em PBS estéril.

Figura 4 - Plaqueamento – UFC (em log 10)/ mL, em diferentes tempos

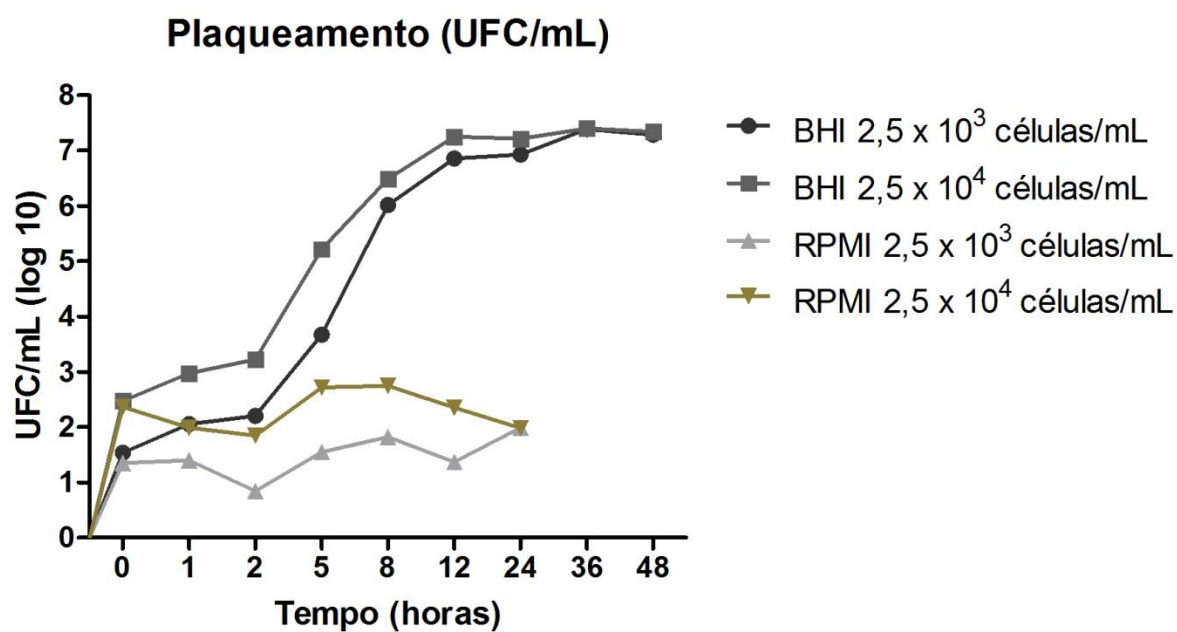
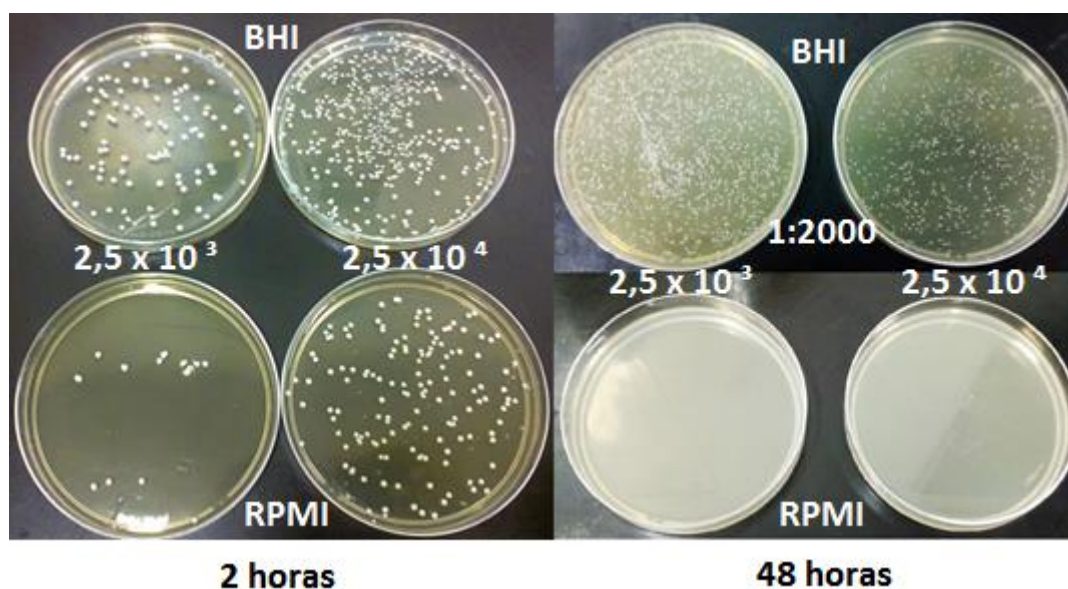


Figura 5 - Placas utilizadas na contagem de UFC/mL



4.2. Sensibilidade da levedura planctônica frente aos antifúngicos sintéticos

Apesar dos resultados satisfatórios dos testes para controle da atividade das drogas, utilizando a cepa ATCC 90028 de *C. albicans*, (CIM de anfotericina B de 0,5 µg/mL, sendo o valor estabelecido na literatura de 0,5 a 2,0 µg/mL) não foi obtido êxito nos resultados nos testes de sensibilidade dos antifúngicos contra o *H. capsulatum*, não obtendo valores de CIM.

4.3. Sensibilidade da levedura planctônica frente aos extratos vegetais

Os valores de CIM do ácido cafeico e derivados contra as leveduras na forma planctônica de *H. capsulatum* estão descritas na tabela abaixo.

Tabela 1 - Valores de CIM do ácido cafeico e derivados para levedura planctônica

Atividade do ácido cafeico e derivados sobre <i>H. capsulatum</i> – Levedura planctônica		
ácido e derivados	Cepas	
	EH-315	EH-331
ácido cafeico	62,5µg/mL	> 250µg/mL
metil éster	15,63µg/mL	62,5µg/mL
etil éster	31,25µg/mL	31,25µg/mL
propil éster	15,63µg/mL	15,63µg/mL
pentil éster	7,81µg/mL	15,63µg/mL
hexil éster	31,25µg/mL	15,63µg/mL
decil éster	0,98µg/mL	0,49µg/mL
dodecil éster	1,95µg/mL	0,49µg/mL

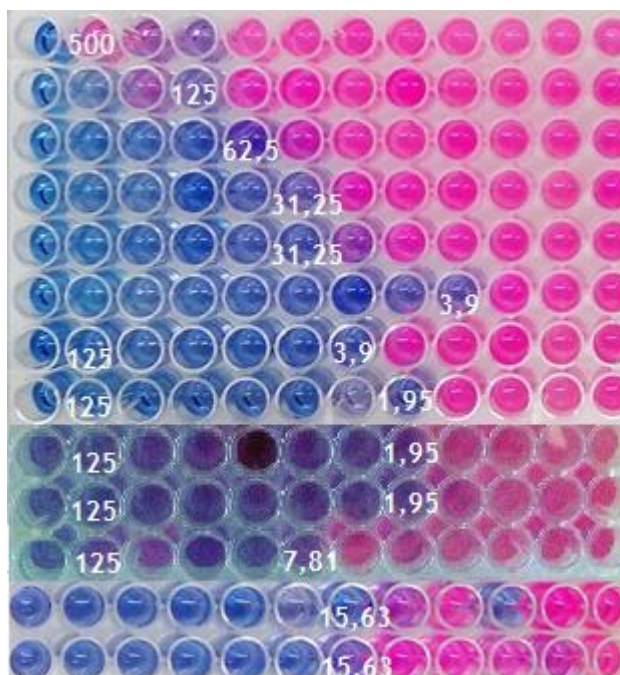
Observamos que os derivados ácido cafeico decil éster e dodecil éster apresentaram os menores valores de CIM.

Os valores de CIM dos protocatecuatos obtidos contra a levedura na forma livre de *H. capsulatum* estão descritas na tabela abaixo. A Figura 6 mostra os resultados visuais por ação do *alarBlue*® das CIM dos protocatecuatos.

Tabela 2 - Valores de CIM visuais dos protocatecuatos para levedura planctônica

Atividade dos protocatecuatos sobre <i>H. capsulatum</i> – Levedura planctônica			
Protocatecuatos	Cepas		
	EH-315	EH-331	EH-335
ácido protocatecuico	250 µg/mL	> 500 µg/mL	125 µg/mL
protocatecuato de etila	250 µg/mL	125 µg/mL	125 µg/mL
protocatecuato de propila	125 µg/mL	62,5 µg/mL	62,5 µg/mL
protocatecuato de butila	31,25 µg/mL	31,25 µg/mL	7,81 µg/mL
protocatecuato de hexila	15,63 µg/mL	31,25 µg/mL	7,81 µg/mL
protocatecuato de heptila	7,81 µg/mL	3,9 µg/mL	1,95 µg/mL
protocatecuato de octila	7,81 µg/mL	3,9 µg/mL	3,9 µg/mL
protocatecuato de nonila	7,81 µg/mL	1,95 µg/mL	1,95 µg/mL
protocatecuato de decila	3,9 µg/mL	1,95 µg/mL	1,95 µg/mL
protocatecuato de dodecila	3,9 µg/mL	1,95 µg/mL	1,95 µg/mL
protocatecuato de tetradecila	3,9 µg/mL	7,81 µg/mL	3,9 µg/mL
protocatecuato de hexadecila	> 500 µg/mL	15,63 µg/mL	250 µg/mL
protocatecuato de octadecila	> 500 µg/mL	15,63 µg/mL	250 µg/mL

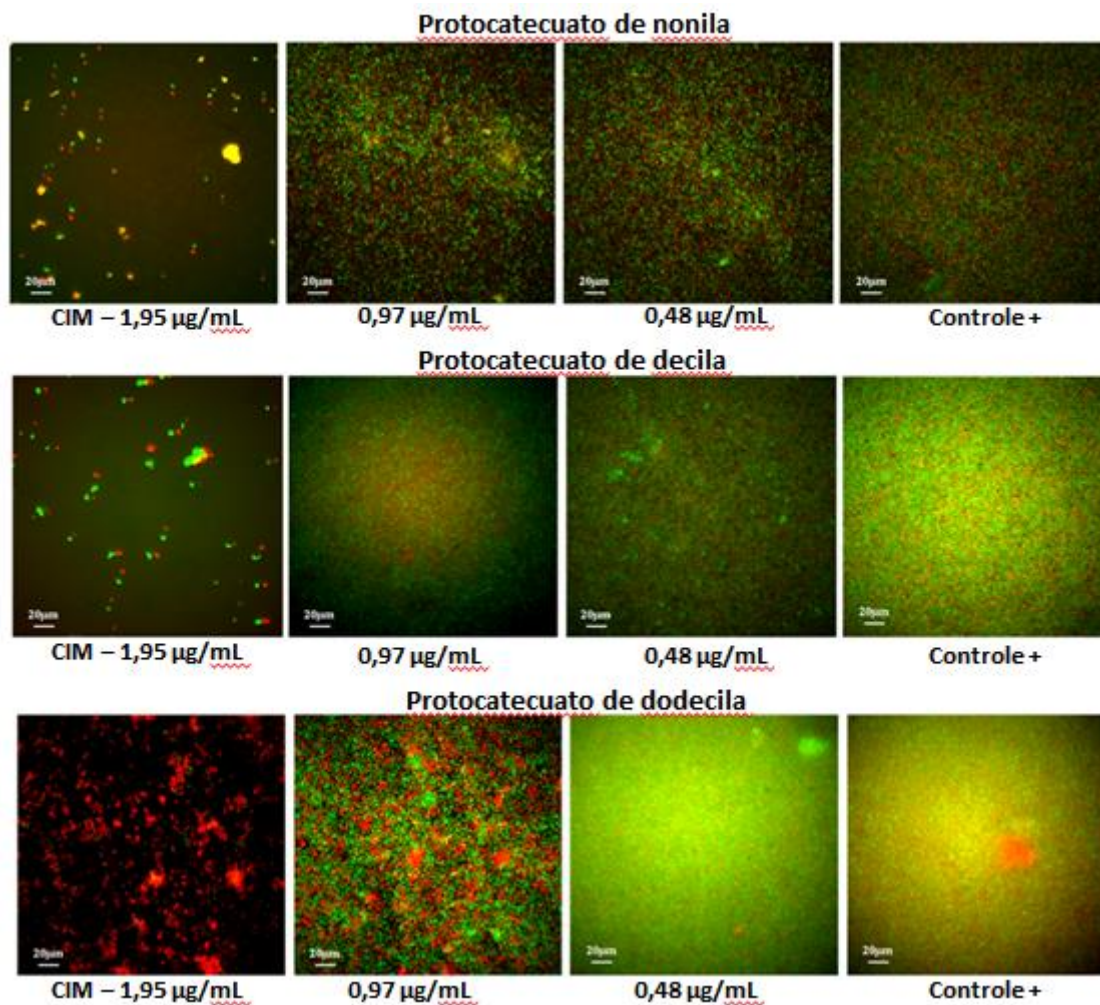
Figura 6 - Leitura das CIM dos protocatecuatos para a levedura livre da cepa EH-331



Observamos que os ésteres protocatecuato de nonila, protocatecuato de decila, e protocatecuato de dodecila apresentaram os menores valores de CIM para as três cepas. A partir desse resultado foram escolhidas as substâncias que seriam testadas nos biofilmes em formação e formado.

Os três ésteres que apresentaram os menores valores de CIM foram também utilizados no teste de viabilidade celular fúngica pelo kit *Live/Dead*®. A Figura 7 representa os resultados obtidos através do uso dos corantes iodeto de propídeo e SYTO9 nos poços da placa de 96 poços, correspondentes à CIM e duas concentrações inferiores de cada protocatecuato, além do controle positivo, que não apresenta o extrato. É possível notar que as células vivas estão coradas em verde, enquanto as células não viáveis estão coradas em vermelho. Embora nos poços correspondentes à CIM dos protocatecuatos de nonila e decila ainda existam células coradas em verde, fica clara a diferença destes em relação às imagens dos controles positivos e concentrações inferiores. Nas imagens correspondentes ao protocatecuato de dodecila, é evidente a atividade do extrato em sua CIM, na qual as células se apresentam coradas em vermelho.

Figura 7 – Análise da viabilidade celular fúngica utilizando o kit Live/Dead®, nas CIM e concentrações inferiores dos protocatecuatos



4.4. Sensibilidade da levedura em biofilme frente aos extratos vegetais

Foram escolhidos os protocatecuatos de nonila, decila e dodecila para prospecção da ação contra os biofilmes formado e em formação do *H. capsulatum*. Foram analisados a CIM visual (Figura 8), de acordo com a mudança de coloração observada na redução do XTT e as CIM₉₀, CIM₈₀ e CIM₅₀, de acordo com os devidos cálculos.

Figura 8 - CIM da proto-nonila para biofilme em formação

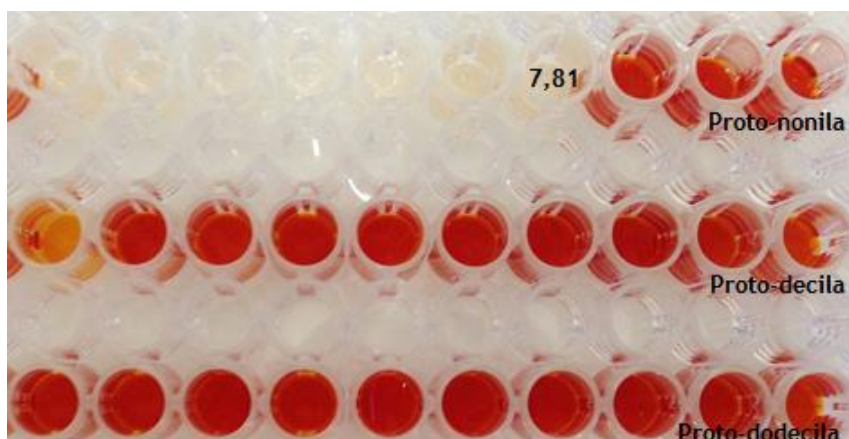


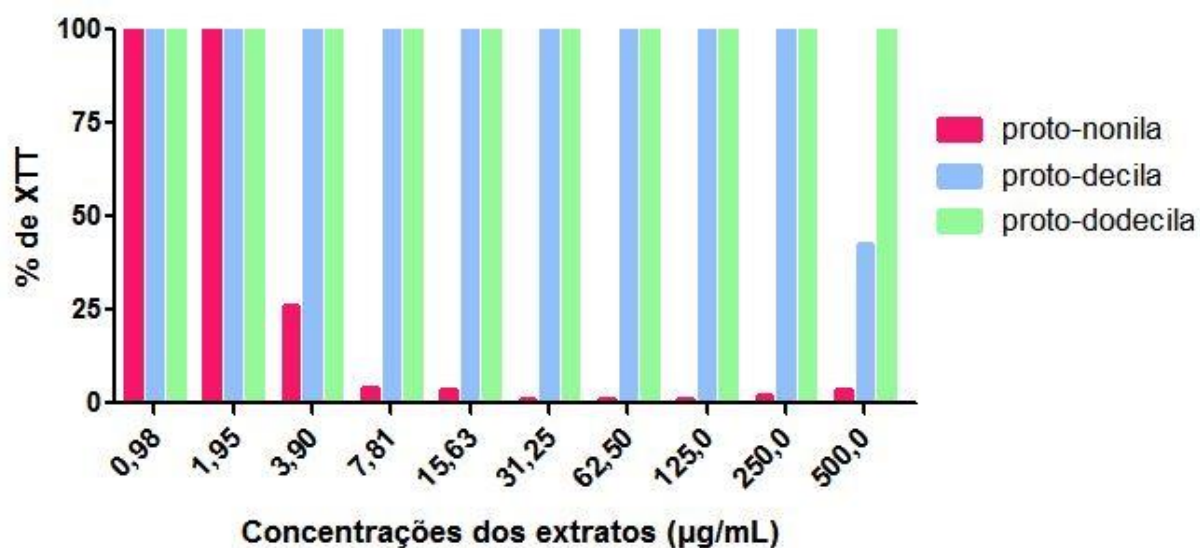
Tabela 3 - CIM, CIM₉₀, CIM₈₀ e CIM₅₀ dos protocatecuatos para biofilme em formação

Atividade dos protocatecuatos sobre <i>H. capsulatum</i> – Cepa EH-331 – Biofilme em formação				
Protocatecuatos	CIM visual	CIM₉₀	CIM₈₀	CIM₅₀
protocatecuato de nonila	7,81 µg/mL	31,25 µg/mL	7,81 µg/mL	3,9 µg/mL
protocatecuato de decila	-	-	-	-
protocatecuato de dodecila	-	-	-	-

No ensaio com o biofilme em formação, não foram obtidas CIM visual, CIM₉₀, CIM₈₀ e CIM₅₀ para os protocatecuatos de decila e dodecila. O protocatecuato de nonila apresentou CIM visual de 7,81 µg/mL, que correspondeu à CIM₈₀. CIM₅₀ foi de 3,9 µg/mL e CIM₉₀ de 31,25 µg/mL.

A partir dos valores de absorbância é possível relacionar a figura 9 com a viabilidade de células fúngicas em cada concentração de extrato testada. Os valores são expressos como porcentagem média de leituras colorimétricas dos ensaios de redução de XTT comparados aos poços de controle positivo e negativo.

Figura 9 - Concentrações do extrato x % de XTT – Biofilme em formação



No ensaio do biofilme formado não foram verificadas CIM₉₀ CIM₈₀ e CIM₅₀ para as três substâncias testadas. No entanto, foi verificado CIM visual do protocatuato de nonila de 125 µg/mL (Figura10).

Figura 10 - CIM da proto-nonila para biofilme formado



Os resultados obtidos demonstram atividade antifúngica do protocatuato de nonila sobre o biofilme maduro e sobre o biofilme em formação. Desta forma, é necessária a investigação da citotoxicidade desta substância, especialmente sobre macrófagos alveolares, que são invadidos pelo *H. capsulatum* desde o início da infecção. O resultado dos ensaios de

toxicidade (CI_{50}) do protocatecuato de nonila sobre macrófagos alveolares, realizados por Soares (2011), foi de 8,10 $\mu\text{g/mL}$. Este valor, juntamente com a CIM_{50} do protocatecuato de nonila de 3,9 $\mu\text{g/mL}$, resultou em um valor de IS de 2,07.

O valor de 2,07 ($<10,0$) indica que a substância (protocatecuato de nonila) é mais seletiva para os macrófagos alveolares do que para as células fúngicas, portanto apresentaria toxicidade para as células do hospedeiro do *H. capsulatum*.

5. DISCUSSÃO

As substâncias de origem vegetal representam um grande trunfo, recentemente explorado na pesquisa de novos tratamentos de patologias. Isso ocorre por conta da vasta biodiversidade brasileira que permite a exploração de várias substâncias contra microrganismos diferentes. E ainda, pela necessidade de novas opções terapêuticas, especialmente no tratamento de doenças fúngicas, as quais estão extremamente relacionadas à ocorrência de tolerância e resistência, o que atualmente já inviabiliza o tratamento com os antifúngicos sintéticos, em diversos casos.

No presente estudo, verificamos os níveis de atividade antifúngica (incluindo antibiofilme) de alguns desses extratos vegetais. E embora alguns ensaios tenham demonstrado resultados diferentes do desejado, a prospecção das substâncias foi de extrema importância, não somente pela verificação de atividade contra o *H. capsulatum*, mas também por servir como fonte de pesquisa contra outros agentes fúngicos e para novas pesquisas.

Ainda que, atualmente não existam relatos na literatura de enfermidades e óbitos diretamente relacionados com a formação de biofilmes de *H. capsulatum* em dispositivos médicos, é importante conhecer substâncias capazes de inibir a formação desses biofilmes. Diversas espécies de *Candida* estão comprovadamente envolvidas em biofilmes em casos de endocardite e outras complicações pelo uso de dispositivos médicos. É necessário focar em casos de histoplasmoses e investigar a possibilidade de adesão e colonização de meios abióticos e os resultados que isso pode acarretar.

Estudos anteriores demonstraram atividade antimicrobiana dos ácidos fenólicos (como o ácido protocatecuico e ácido cafeico, de maior interesse no estudo) incluindo a inibição de adesão celular e formação de biofilmes de *Candida parapsilosis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans* (PALÍKOVÁ et al., 2008). No entanto, não há

relatos de substâncias naturais agindo sobre o *H. capsulatum* em sua forma de biofilme, pois este fenômeno só foi relacionado a este fungo recentemente.

A atividade demonstrada pelos derivados do ácido cafeico sobre a levedura livre do *H. capsulatum* pode ser explicadas através de mecanismos relatados por alguns autores. Um deles é a possível atuação do ácido em um determinado local da membrana celular do microrganismo, o que causa danos estruturais e funcionais. O extrato de própolis, que contém ácido cafeico em sua composição, demonstrou ainda ação sobre fatores de virulência (enzima coagulase) de *Staphylococcus aureus* e um efeito preventivo dose-dependente na formação de biofilmes do mesmo microrganismo (BARRIENTOS, et al., 2013).

Embora o valor de IS do protocatecuato de nonila obtido no estudo indique certa toxicidade do mesmo para os macrófagos alveolares, vale ressaltar que o estudo em questão é apenas inicial, e requer ainda a busca por outras estratégias e novas substâncias que apresentem a mesma atividade, sem se apresentar como tóxica às células hospedeiras. O que já pode ser pensado como possível estratégia é a associação do protocatecuato com as drogas sintéticas ou outras substâncias, que juntas apresentem atividade sinérgica e menos citotóxica, pela possibilidade de utilização de menores concentrações.

A associação de substâncias naturais à terapia antimicrobiana convencional já foi relatada por diversos autores. Shin e Kang (2003) demonstraram que a associação de substâncias presentes no óleo essencial da espécie vegetal *Agastache rugosa* com cetoconazol diminuiu significativamente os valores de CIM das substâncias sobre o fungo *Blastoschizomyces capitatus*. Zago e colaboradores (2009) demonstraram maior suscetibilidade de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* frente à ação de antimicrobianos quando associados a diferentes óleos essenciais de espécies vegetais. Além disso, também há relatos da interação benéfica entre duas ou mais substâncias naturais sobre os microrganismos, como na associação dos óleos essenciais de cravo e canela, capaz de inibir o crescimento de fungos importantes na deterioração de uvas e

outros alimentos, como *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus niger* e *Alternaria alternata*. (SUKATTA et al., 2088). Desta forma, novos estudos, na tentativa de obtenção de resultados mais satisfatórios como a menor toxicidade, menores concentrações das substâncias e mais opções terapêuticas, se mostram válidos e necessários.

Através dos resultados obtidos no estudo em questão, fica evidente também que alguns ensaios (como o teste de sensibilidade frente aos antifúngicos sintéticos) devem ser padronizados, o que contribuiria para o melhor conhecimento do perfil do *H. capsulatum* quanto seu ciclo de vida, condições de infecção e resposta às substâncias sintéticas e naturais.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados observados é possível inferir que o desenvolvimento de protótipos antifúngicos a partir de substâncias naturais pode representar uma solução para os casos de ineficácia terapêutica, tolerância e resistência ao arsenal terapêutico atual. Ainda há diversos aspectos a serem estudados, mas o presente estudo forneceu informações necessárias para os futuros trabalhos e que podem dar continuidade a este. Conclui-se na prospecção de extratos vegetais, que as substâncias, neste caso, os protocatecuatos e o ácido cafeico e derivados, apresentam diferentes níveis de atividade contra o *H. capsulatum*. E que além da existência de uma substância antibiofilme (protocatecutato de nonila), existem substâncias capazes de inibir as leveduras planctônicas de *H. capsulatum* em baixas concentrações (decil e dodecil ésteres, derivados do ácido cafeico). Isto justificaria o emprego destas em novos testes frente ao biofilme, na busca de novas substâncias capazes de inibir e destruir o mesmo. A melhor investigação destes e demais extratos ainda é importante, principalmente pela necessidade de busca de outros compostos capazes de inviabilizar a formação do biofilme e na padronização de ensaios, como os de sensibilidade aos antifúngicos sintéticos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRIENTOS, L.; HERRERA, C.L.; MONTENEGRO, G.; ORTEGA, X.; VELOZ, J.; ALVEAR, M.; CUEVAS, A.; SAAVEDRA, N.; SALAZAR, L.A. Chemical and botanical characterization of Chilean propolis and biological activity on cariogenic bacteria *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. **Brazilian Journal of Microbiology.**, v.44, n.2, p. 577-585, out., 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24294257>>. Acesso em: dez.2013.

BRANDÃO, M. G. L.; COSENZA, G. P.; PEREIRA, F. L.; VASCONCELOS, A. S.; FAGG, C. W. Changes in the trade in native medicinal plants in Brazilian public markets. **Environmental and Monitoring Assessment**, v. 185, n. 8, p. 7013–7023, jan., 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23322507>>. Acesso em: out. 2013.

BRILHANTE, R. S.; FECHINE, M. A.; MESQUITA, J. R., CORDEIRO, R.A.; ROCHA, M.F.; MONTEIRO, A. J.; LIMA, R. A.; CAETANO, É. P.; PEREIRA, J. F.; CASTELO-BRANCO, D. S.; CAMARGO, Z. P.; SIDRIM, J. J. Histoplasmosis in HIV-positive patients in Ceará, Brazil: clinical-laboratory aspects and in vitro antifungal susceptibility of *Histoplasma capsulatum* isolates. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.**, v. 106, n. 8, p. 484-488, ago. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22703696>>. Acesso em: out. 2013.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents) - **Brazilian Journal of Medical and Biology**

Research, vol. 33 n. 2, p. 179-189, fev., 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10657057>>. Acesso em: out. 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast**: approved standard, 3 ed., M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa. 2008

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**., v. 49, p. 711-745. 1995. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8561477>>. Acesso em: set., 2013.

FARIA, R.N. **Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico da folha de *Phanera flexuosa* (Moric.) L.P.QUEIROZ (Caesalpinioideae) e da inibição de fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos**. 2012. 129 f. Tese (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Ciências Fisiológicas/Sociedade Brasileira de Fisiologia, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2012. Disponível em: <https://repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/10445>>. Acesso em: jan. 2014.

FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S. Histoplasmosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**., v. 42, n 2, p. 192-198. mar/abr., 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19448941>>. Acesso em: jul. 2013.

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 Washington, D.C.**, v. 3, n. 9, - p. 416–423, set., 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20628478>>. Acesso em: ago. 2013.

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. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S113014061100101X>>. Acesso em: jul. 2013.

GUIMARÃES, A. J.; NOSANCHUK, J. D.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. Diagnosis of histoplasmosis. **Brazilian Journal of Microbiology**., v. 37, n. 1, p. 1-13, jan. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2863343/>>. Acesso em: ago. 2013.

GULLO, F. P.; SARDI, J. C. O.; SANTOS, V. A. F. F. M.; SANGALLI-LEITE, F.; PITANGUI, N. S.; ROSSI, S. A.; De PAULA E SILVA, A. C. A.; SOARES, L. A.; SILVA, J. F.; OLIVEIRA, H. C.; FURLAN, M.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; 1 FUSCO-ALMEIDA, A. M. Research Article - Antifungal Activity of Maytenin and Pristimerin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2012/340787>>. Acesso em: out. 2013.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P.; KATHJU, S.; HOIBY, N.; MOSER, C.; COSTERTON, J. W.; MOTER, A.; BJARNSHOLT, T. Minireviews - Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**.,

v. 65, p. 127–145, mai., 2012. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22469292>>. Acesso em: set. 2013

HÖFLING, J. F.; ANIBAL, P. C.; OBANDO-PEREDA, G. A.; PEIXOTO, I. A. T.; FURLETTI, V. F.; FOGLIO, M. A.; GONÇALVES, R. B. Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. **Brazilian Journal of Biology**., v. 70, n. 4, p. 1065-1068, nov. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21180915>>. Acesso em: out. 2013.

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. **European journal of lipid science and technology**., v. 115, n. 7, p. 747-755, jul. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23997655>>. Acesso em: out. 2013.

KAUFFMAN, C. A. Histoplasmosis. **Clinics in Chest Medicine**., v. 30, n. 2, p. 217-225, jun., 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19375629>>. Acesso em: ago. 2013.

KUHN, D. M.; BALKIS, M.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K. GHANNOUM, M. A. Uses and Limitations of the XTT Assay in Studies of *Candida* Growth and Metabolism. **Journal Of Clinical Microbiology**. v. 41, n.1, p. 506-508, jan. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC149594/>>. Acesso em: out. 2013.

KULKARNIA, R. R.; TUPEB, S. G.; GAMPLEC, S. P.; CHANDGUDEA, M. G.; SARKAR, D.; DESHPANDEB, M. V.; JOSHIA, S. P. Antifungal dimeric chalcone derivative

kamalachalcone E from *Mallotus philippinensis*. **Natural Product Research.**, out., 2013.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2013.843178>>. Acesso em: out. 2013.

KWON, Y.I.; VATTEM, D. A.; SHETTY, K. Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition.**, v. 15, n. 1, p. 107-118, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16500886>>. Acesso em: out. 2013.

LEÓN, M. G. F.; LÓPEZ, G. A.; TAYLOR, M. L. ALTAMIRANO G. A.; REYES-MONTESA, M. R. Development of specific sequence-characterized amplified region markers for detecting *Histoplasma capsulatum* in clinical and environmental samples. **Journal of Clinical Microbiology**, Cidade do México, v. 50, 2. 3, p. 673-679, dez., 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22189121>>. Acesso em jul. 2013.

LIN, C. Y.; HUANG, C. S.; CHUANG, C. Y.; YIN, M. C. Anticoagulatory, anti-inflammatory and antioxidative effects of protocatechuic acid in diabetic mice. v. 57, n. 15, p. 6661-6667, ago., 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19722571>>. Acesso em: out. 2013.

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. **Archives of Toxicology**, v. 77, n. 1, p. 42-47, jan., 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12491040>>. Acesso em: out. 2013.

LIU, W.H.; HSU, C. C.; YIN, M. C. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of diallyl sulphides and protocatechuic Acid. **Phytotherapy Research.**, v. 22, n. 1, p. 53-57, jan., 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17705145>>. Acesso em: out. 2013.

MARESCA, B; KOBAYASHI, G. S. Dimorphism in *Histoplasma capsulatum*: a Model for the Study of Cell Differentiation in Pathogenic Fungi. **Microbiological Reviews.**, v. 53, n. 2, p.186-209, 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC372727/>>. Acesso em: ago. 2013.

MUÑOZ, B.; MARTÍNEZ, M. A.; PALMA G.; RAMÍREZ A.; FRÍAS M. G.; REYES M. R.; TAYLOR, M. L.; HIGUERA A. L.; CORCHO A.; MANJARREZ M. E. Molecular characterization of *Histoplasma capsulatum* isolated from an outbreak in treasure hunters. **BMC Infectious Diseases.**, v. 10, p. 264-270, set., 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20825675>>. Acesso em: jul. 2013.

NAKAYAMA, G. R.; CATON, M.C.; NOVA, M.P.; PARANDOOSH, Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. **Journal of Immunological Methods.**, v. 204, n. 2, p. 205-208, mai., 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9212838>>. Acesso em: jan.2014.

NEWMAN, S. L.; LEMEN, W.; SMULIAN, A. G. Dendritic cells restrict the transformation of *Histoplasma capsulatum* conidia into yeasts. **Medical Mycology**, v. 49, n. 4, p. 356–364, out. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21039309>>. Acesso em: ago. 2013.

NOSANCHUK, J. D.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; HAMILTON, A. J.; A. J. GUIMARÃES. Antibody therapy for histoplasmosis. **Frontiers in Microbiology – Fungi and Their Interactions**, v. 3, n. 21, p. 1-7, fev., 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22347215>>. Acesso em: jul.2013.

NOSANCHUK, J. D.; GACSER, A. *Histoplasma capsulatum* at the host - pathogen interface. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 9, p. 973-977, jul., 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18672088>>. Acesso em: jul. 2013.

O'BRIAN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry.**, v.267, n.17, p. 5421-5426, set., 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10951200>>. Acesso em: jan. 2014.

OLIVEIRA, R. M. F. F. **Avaliação, in vitro, da sensibilidade de *Giardia lamblia* ao metronidazol.** 2010. 143 f. Tese (Mestrado em Toxicologia) - Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, 2010. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10773/906>>. Acesso em out. 2013.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; MERTENS-TALCOTT, S.; TALCOTT, S. T. Chemical composition, antioxidant properties, and thermal stability of a phytochemical enriched oil from açai (*Euterpe oleracea* Mart.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry.**, v. 56, n. 12, p. 4631-4636, jun., 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18522407>>. Acesso em: out. 2013.

PALÍKOV, I.; HEINRICH, J.; BEDNÁR, P.; MARHOL, P.; KREN, V.; CVAK, L.; VALENTOVÁ, K.; RUZICKA, F.; HOLÁ, V.; KOLÁR, M.; SIMÁNEK, V.; ULRICHOVÁ, J. Constituents and antimicrobial properties of blue honeysuckle: A novel source for phenolic antioxidants. **Journal of agricultural and food chemistry.**, v. 56, n.24, p. 11883-11889, dez., 2008. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf8026233>>. Acesso em: jan. 2014.

PARK, J. S.; HAN, K. The spermatogenic effect of yacon extract and its constituents and their inhibition effect of testosterone metabolism. **Biomolecules & Therapeutics.**, v. 21, n. 2, p. 153-160, mar., 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24009874>>. Acesso em: jan.2014.

De PAULA e SILVA, A.C.A.; OLIVEIRA, H.C.; SILVA, J.F.; SANGALLI-LEITE, F.; SCORZONI, L.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Microplate alamarBlue assay for Paracoccidioides susceptibility testing. **Journal of Clinical Microbiology.**, v. 51, n. 4, p. 1250-1252, abr., 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23345296>>. Acesso em: set. 2013.

PEDROZA, B. E. P. **Histoplasose associada a HIV/AIDS. Estudo descritivo de causuística em um centro de pesquisa no Rio de Janeiro (1987-2002).** 2003. 123 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Tropical, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2003. Disponível em: <<http://arca.icict.fiocruz.br/handle/icict/7214>>. Acesso em: ago. 2013.

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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21048668>>. Acesso em: set. 2013.

PIERCE, C. G.; SRINIVASAN, A.; UPPULURI, P.; RAMASUBRAMANIAN, A. K.; LÓPEZ-RIBOT, J. Antifungal therapy with an emphasis on biofilms. **Current Opinion in Pharmacology**., v. 13, p. 1-5, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24011516>>. Acesso em: set. 2013.

PITANGUI, N. S.; SARDI, J. C. O.; SILVA, J. F.; BENADUCCI, T.; MORAES DA SILVA, R.A.; RODRÍGUEZ-ARELLANES, G.; TAYLOR, M. L.; M.J.S. MENDES-GIANNINI, M. J. S.; FUSCO ALMEIDA, A. M. ; Adhesion of *Histoplasma capsulatum* to pneumocytes and biofilm formation on an abiotic surface. **Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**., v. 28, n. 7, p. 711-718, jun., 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22784100>>. Acesso em: jul. 2013.

PONTES, L. B. **Características clínicas e evolução dos pacientes com histoplasmose disseminada e AIDS atendidos em hospital de referência do Ceará**. 2008. 86 f. Tese (Mestrado em Saúde Pública/Epidemiologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

PRADO MARTIN, J. G.; PORTO, E.; de ALENCAR, S. M.; da GLÓRIA, E. M.; CORRÊA, C. B.; CABRAL, I. S. R. Antimicrobial activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) against food pathogens. **Revista argentina de microbiologia**., v. 45, n. 2, p. 93-98, abr/jun., 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23876271>>. Acesso em: dez. 2013.

RAMAGE, G.; MOWAT, E.; JONES, B.; WILLIAMS, C.; LOPEZ-RIBOT, J. Our current understanding of fungal biofilms. **Critical Reviews in Microbiology**., v. 35, n. 4, p. 340-355, ago., 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19863383>>. Acesso em: set. 2013.

RAMAGE, G.; RAJENDRAN, R.; SHERRY L.; WILLIAMS, C. Fungal biofilm resistance. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3299327/>>. Acesso em: out. 2013.

RAMAGE G.; WALLE, K. V.; WICKES, B. L.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. Standardized Method for In Vitro Antifungal Susceptibility Testing of *Candida albicans* Biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**., v. 45, n. 9, p. 2475-2479, jun., 2001. Disponível em: <<http://aac.asm.org/content/45/9/2475>>. Acesso em: out. 2013.

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. **Journal of agricultural and food chemistry**., v. 58, n. 11, p. 6986-6993, jun., 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20446740>>. Acesso em: out. 2013.

RIBEIRO, J. F. *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*: Taxa de conversão *in vitro*, detecção do gene *ryp 1* e estudo da diversidade genética de cepas brasileiras. 2012. 115 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Médica) – Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

SARDI, J.C.; ALMEIDA, A.M.; MENDES GIANNINI, M.J. New antimicrobial therapies used against fungi present in subgingival sites - A brief review. **Archives of Oral Biology.**, v. 56, n. 10, p. 951-959, out., 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21676377>>. Acesso em: out. 2013.

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. **Journal of Medical Microbiology.** v. 62, n. 1, p. 10-24, jan., 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23180477>>. Acesso em: out. 2013.

SHIN, S.; KANG, C.A. Antifungal activity of the essential oil of *Agastache rugosa* Kuntze and its synergism with ketoconazole. **Letters in Applied Microbiology.**, v. 36, n.2, p. 111-115, jan., 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12535132>>. Acesso em: jan.2014.

SIZEMORE, T. C. Rheumatologic manifestations of histoplasmosis: a review. **Rheumatology International.**, Greenville, v. 33, n. 12, p. 2963-2965, jul., 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23835880>> Acesso em: ago. 2013.

SOARES, L. A. - **Estudo da atividade antidermatofítica de protocatecuatos contra *T. rubrum* e *T. interdigitale*.** 2011. 85 f. Tese (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011. Disponível em: <<http://acervodigital.unesp.br/handle/123456789/62117>>. Acesso em: ago. 2013.

SUKATTA, U.; HARUTHAITHANASAN, V.; CHANTARAPANONT, W.; DILOKKUNANANT, U.; SUPPAKUL, P. Antifungal activity of clove and cinnamon oil and their synergistic against postharvest decay fungi of grape *in vitro*. **Natural Science (Kasetsart J.)**, v. 42, n. 5, p. 169 – 174, 2008. Disponível em: <http://kasetsartjournal.ku.ac.th/kuj_files/2009/A0903191400326718.pdf>. Acesso em: jan. 2014.

TAIRA, J.; UEHARA, M.; TSUCHIDA, E.; OHMINE, W. Inhibition of the β -Catenin/Tcf Signaling by Caffeoylquinic Acids in Sweet Potato Leaf through down Regulation of the Tcf-4 Transcription. **Journal of agricultural and food chemistry**., 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24308429>>. Acesso em: jan. 2014.

VIDYANATH, S.; SHAMEENA, P. M.; SUDHA, S.; NAIR, R. G. Disseminated histoplasmosis with oral and cutaneous manifestations. **Journal of oral and maxillofacial pathology**., v. 17, n. 1, p. 139-142, jan/abr. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23798850>>. Acesso em: ago. 2013.

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 Infectious Diseases**., v. 13, p. 143. Mar., 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23514617>>. Acesso em: ago. 2013.

ZAGO, J.A.A.; USHIMARU, P.I.; BARBOSA, L.N.; FERNANDES JUNIOR, A. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de**

Farmacognosia., v.19, n.4, p. 828-833. Out/Dez., 2009. Disponível em:

<<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v19n4/05.pdf>>. Acesso em: jan. 2014.

De acordo,

Araraquara, 13 de Janeiro de 2014.

Maysa Yoshino Rosinha
(Orientanda)

Ana Marisa Fusco Almeida
(Orientadora)