



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
UNIDADE ACADÊMICA DE SAÚDE
CURSO BACHARELADO EM FARMÁCIA

RISLEY NIKAEL MEDEIROS SILVA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA RIPARINA E SEUS
DERIVADOS: EFEITO SOBRE O CRESCIMENTO E O BIOFILME
DOS DERMATÓFITOS.**

CUITÉ – PB

2022

RISLEY NIKAEL MEDEIROS SILVA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA RIPARINA E SEUS
DERIVADOS: EFEITO SOBRE O CRESCIMENTO E O BIOFILME
DOS DERMATÓFITOS.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de farmácia da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof. Dr. **Fillipe de Oliveira Pereira**

CUITÉ-PB

2022

S586a Silva, Risley Nikael Medeiros.

Atividade antifúngica da riparina e seus derivados: efeito sobre o crescimento e o biofilme dos dermatófitos. / Risley Nikael Medeiros Silva. - Cuité, 2023.

32 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, 2023.

"Orientação: Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira".

Referências.

1. Antifúngico. 2. Dermatofitose. 3. Fungos. 4. Riparinas. 5. Biofilme. 6. Dermatofitose – atividade antifúngica. 7. Antifúngico - dermatófitos. I. Pereira, Fillipe de Oliveira. II. Título.

CDU 615.281.9(043)

Agradecimento

Agradeço a Deus por ter me fortalecido nos momentos de fraqueza, por ter me conduzido nos momentos de instabilidade e por ter me proporcionado tantas oportunidades excepcionais na minha vida, principalmente nos aspectos acadêmicos. Sempre tento manter a fé e penso que tudo na vida tem um propósito dado por Deus, proporcionando crescimento como pessoa e profissional.

Agradeço imensamente a Universidade Federal de Campina Grande – Campus Cuité e aos professores que compõem o centro acadêmico de Farmácia, por me possibilitarem concluir minha formação acadêmica e profissional de maneira tão satisfatória e magistral, sendo agora parte de mais uma das minhas realizações pessoais.

Agradeço imensamente e de forma extremamente sincera ao meu excelentíssimo orientador, Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira por ter me dado a honra de participar desse brilhante trabalho, compartilhando conhecimentos enriquecedores e conduzido com maestria seu orientando.

Agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico por terem apoiado a realização do projeto. Além do Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal da Paraíba (Brasil), que forneceram as cepas utilizadas na realização do projeto, facultado essa que também forneceram as riparinas utilizadas.

Agradecer a todos os integrantes do grupo FUNGI, pois foram muitos conhecimentos compartilhados, por toda a parceria durante ao processo de conclusão do projeto, não podendo esquecer de agradecer de forma especial meus companheiros de laboratório Emanuel Pereira e Marcelo Nóbrega.

Agradeço a Dr^a Bruna Braga Dantas e a MSc. Anna Paula de Castro Texeira que aceitaram participar da minha banca de defesa de trabalho e que com certeza contribuirão para aperfeiçoamento deste trabalho.

Agradecer imensamente e imensuravelmente aos meus familiares, Pai (José Ricardo da Silva) e Mãe (Nilsa Pereira de Medeiros Silva) que foram os principais responsáveis por me fazerem chegar até aqui, por toda a educação, conselho e ajuda que me deram. A distância foi um ponto extremamente complicado de lidar, mas no final toda a luta foi vencida tanto pra mim pessoalmente, quanto para eles, guerreiros que através de seus esforços se tornaram meu exemplo de vida. Agradecer as minha irmãs Raysla Nikaely e Raissa Nikely, e as amigas verdadeiras construídas durante toda essa jornada.

Resumo

A dermatofitose, uma das micoses superficiais mais frequentes no mundo, está associada principalmente a infecções pelos dermatófitos *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* e *Nannizzia gypsea*. Como tratamento são utilizadas alternativas terapêuticas sistêmicas, como comprimidos e locais como cremes e pomadas, como exemplo o Fluconazol e Griseofulvina. A produção do biofilme é um fator essencial na patogênese dos dermatófitos, pois confere resistência e recalcitrância ao fármaco, o que prejudica significativamente a eficácia dos antifúngicos. Por isso o objetivo desse estudo foi analisar a atividade antidermatofítica da riparina natural 1 (RIP1) e de sintéticos de nor (NOR1) e dinor (DINOR1) e a atividade antibiofilme. Utilizamos *modelos in vitro* (placas de poliestireno de 96 poços) e *ex vivo* (fragmentos de cabelo) para verificar os efeitos desses compostos na formação e viabilidade de biofilmes. RIP1 e NOR1 apresentaram atividade antifúngica contra cepas de *T. rubrum* e *M. canis*, mas DINOR1 não apresentou atividade antifúngica significativa contra os dermatófitos. Além disso, RIP1 e NOR1 reduziram significativamente a viabilidade de biofilmes *in vitro* e *ex vivo* ($p < 0,05$). No entanto, RIP1 foi mais potente que NOR1, possivelmente devido à distância entre as estruturas p-metoxifenil e fenilamida. Em conclusão, RIP1 e NOR1 apresentam atividades antifúngicas e antibiofilme significativas, demonstrando potencial para serem utilizadas no desenvolvimento de fármacos direcionados ao tratamento de dermatofitoses.

Palavras-chave: Dermatofitoses, Fungos, Riparinas, Biofilme.

Abstract

Dermatophytosis, one of the most common superficial mycoses in the world, is mainly associated with infections by the dermatophytes *Trichophyton rubrum* and *Microsporum canis*. Biofilm production is an essential factor in the pathogenesis of dermatophytes, as it confers resistance and recalcitrance to the drug, which significantly impairs the effectiveness of antifungal agents. Systemic therapeutic alternatives are used as treatment, such as pills and local creams and ointments, such as Fluconazole and Griseofulvin. Therefore, we evaluated the antibiofilm effect of riparin 1 (RIP1), an alkaloid-like alkaloid, against clinically relevant dermatophytes. We have also produced synthetic homologues of nor (NOR1) and dinor (DINOR1) for pharmacological evaluation, with a yield of 61-70%. We used in vitro (96-well polystyrene plates) and ex vivo (hair fragments) models to verify the effects of these compounds on biofilm formation and viability. RIP1 and NOR1 showed antifungal activity against *T. rubrum* and *M. canis* strains, but DINOR1 did not show significant antifungal activity against dermatophytes. Furthermore, RIP1 and NOR1 significantly reduced the viability of biofilms in vitro and ex vivo ($p < 0.05$). However, RIP1 was more potent than NOR1, possibly due to the distance between p-methoxyphenyl and phenylamide structures. In conclusion, RIP1 and NOR1 have significant antifungal and antibiofilm activities, demonstrating potential to be used in the development of drugs aimed at the treatment of dermatophytosis.

Keywords: Dermatophytes, Fungi, Riparins, Resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem microscópica da morfologia do dermatófito <i>Nannizzia gypsea</i>	17
Figura 2 – Representação clínica e microscopia morfológica do dermatófito <i>Microsporum canis</i>	20
Figura 3 - Representação macroscópica de cultura do <i>Trichophyton rubrum</i>	21
Figura 4 – Representação ilustrativa da formação do Biofilme.....	23
Figura 5 – Efeito da riparina 1 e do nor homólogo na produção de biofilme por dermatófitos. Esses resultados expressam a absorvância da coloração de cristal violeta a 570 nm.....	23
Figura 6 – Efeito da riparina 1 e <i>nor</i> homóloga na viabilidade de biofilmes <i>in vitro</i> de dermatófitos pela quantificação do número de unidades formadoras de colônias (UFC).....	28
Figura 7 – Efeito da riparina 1 e seu homólogo <i>nor</i> sobre a viabilidade de biofilmes <i>ex vivo</i> de dermatófitos pela quantificação do número de unidades formadoras de colônias (UFC).....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de MIC e MFC ($\mu\text{g/mL}$) da riparina 1 e seus homólogos *nor* e *dinor* contra cepas de dermatófitos.27

Tabela 2 - Produção *ex vivo* de biofilme por dermatófitos na ausência (controle) e na presença da riparina 1 e do *nor* homólogo30

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABD	Ágar Batata Dextrose
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade Óptica
DOc	Densidade Óptica de Corte
DP	Desvio Padrão
NaCl	Cloreto de Sódio
CES	Centro de Educação e Saúde
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DINOR1	Dinor-riparina 1
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
NOR1	Nor-riparina 1
RIP1	Riparina 1
TRB	Terbinafina
UAS	Unidade Acadêmica de Saúde
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
°C	Grau Célsius
mL	Mililitro
µL	Microlitros
µg/mL	Micrograma por Mililitro
µm	Micrômetro

% Percentual

Sumário

1. INTRODUÇÃO	6
2. OBJETIVOS	8
2.1 Objetivo geral	8
2.2 Objetivos específicos	8
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	9
3.1 Dermatofitos e dermatofitoses	9
3.2 Características dos dermatofitos <i>T. rubrum</i> , <i>M. canis</i> e <i>N. gypsea</i>	10
3.3 Formas de tratamento farmacoterapêutico para as dermatofitoses	12
3.4 Biofilme e resistência aos antifúngicos	13
3.5 Riparinas	14
4. MATERIAL E MÉTODO	16
4.1 Drogas-teste	16
4.2 Fungos	17
4.3 Atividade antifúngica	17
4.4 Atividade anti-biofilme	18
4.5 Fragmentos de fios de cabelo	19
4.6 Efeitos sobre a formação do biofilme ex vivo	19
4.7 Análise estatística	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
6. CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

As dermatofitoses são uma das principais causas de lesões superficiais do mundo, ocasionadas por dermatófitos que possuem alta atração por tecido queratinizado como pele, cabelo, barba e unha. Seus principais agentes infecciosos são os fungos *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, responsáveis por infectar pessoas de todas as raças, idades, sexos e condições sociais (DE OLIVEIRA PEREIRA et al., 2021).

Microsporum canis é o principal agente responsável por causar *tinea capitis* (dermatofitose do couro cabeludo) em crianças no Brasil, contraído principalmente pelo contato dos indivíduos com animais já infectados. *Nannizzia gypsea*, é um fungo geofílico que está envolvido tanto na causa de micoses em pessoas, quanto em animais por todo o mundo, tornando-se uma micose crítica quando tratado da forma inadequada. *Trichophyton rubrum* é um fungo que coloniza a superfície da pele humana, responsável por causar onicomicoses, pé de atleta e dermatofitoses por todo o corpo humano, além de ser bastante comum nos casos de infecção de pele em humanos (PEIXOTO et al., 2019).

Um dos principais motivos que tornam o tratamento de dermatofitoses longos é a formação de biofilmes provocada pelos fungos. Essa forma de resistência e defesa dos fungos é responsável por torná-los mais resistentes ao estresse ambiental e aos medicamentos utilizados para combatê-los. Um dos principais mecanismos responsáveis por tornar esses fungos mais resistentes é a Bomba de efluxo, podendo provocar a absorção de nutrientes e efluxo de drogas, diminuindo a concentração delas na célula fúngica e conseqüentemente o efeito sobre o fungo. Assim, as formas de resistências que os dermatófitos adquirem acaba se tornando uma preocupação para a medicina tradicional, pois as terapias acabam se tornando limitadas para o tratamento e cada vez mais escarças, o que demonstra a necessidade de manter as buscas por novos antifúngicos (LIN et al., 2019).

Com toda a necessidade de desenvolver novas alternativas farmacológicas, produtos naturais acabam se tornando um caminho que servirá para criar novas alternativas de substâncias com potencial terapêutico (NEWMAN; CRAGG, 2016). As riparinas naturais são metabólitos secundários responsáveis por servirem de base para a síntese de Nor- e Dinor-

riparinas, os quais tiveram suas capacidades farmacológicas investigadas, e demonstraram grande variedade de ação farmacoterapêutico (NASCIMENTO, et al., 2016).

Assim, com o vasto potencial terapêutico tanto das riparinas naturais, quanto das Nor- e Dinor-riparinas, acaba tornando-se viável a análise *in vitro* e *ex vivo* desses compostos frente aos fungos dermatófitos e ao biofilme por eles formado, já que o surgimento de formas de defesas contra as alternativas terapêuticas já atuais acaba exigindo a busca por novas alternativas de tratamento.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar atividade antifúngica das Riparinas naturais, Nor e Dinor-riparinas sintéticas sobre a dermatofitose ocasionada pelo *M. canis*, *T. rubrum* e *N. gypsea*.

2.2 Objetivos específicos

Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de riparinas naturais, nor- e dinor-riparinas sintéticas em cepas *M. canis*, *T. rubrum* e *N. gypsea*.

Determinar a concentração fungicida mínima (CFM) das drogas testadas contra *M. canis*, *T. rubrum* e *N. gypsea*

Analisar *in vitro* e *ex vivo*, a atividade das drogas- testes contra o biofilme das cepas de *M. canis*, *T. rubrum* e *N. gypsea* formadoras desse sistema de resistência.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Dermatofitos e dermatofitoses

As dermatofitoses são micoses cutâneas causadas por fungos que atingem principalmente tecidos queratinizados como pele, cabelo e unhas, podendo gerar infecções cutâneas, subcutâneas ou em casos extremos infecções sistêmicas. Seus principais agentes etiológicos são fungos filamentosos, hialinos, queratinofílicos e septados, denominados de dermatofitos, os quais são responsáveis por liberarem enzimas líticas e absorverem os nutrientes adquiridos através da degradação da queratina (DE OLIVEIRA PEREIRA et al., 2021).

São capazes de invadir e colonizar tecidos queratinizados como cabelo, unhas, pelos do corpo e estrato córneo, provocando infecções superficiais, principalmente por causa da queratina que é uma fonte de carbono, enxofre e nitrogênio. Suas infecções possuem classificação de acordo com o tipo e o local em que estão dispostas, referindo-se clinicamente como “tinha”, a exemplo *tinea pedis* (pés), *tinea unguium* (unhas) e *tinea capitis* (couro cabeludo) (HUBE et al., 2015; GNAT et al., 2019).

A dermatofitose é uma doença que possui alta prevalência por todo o mundo, variando de acordo com a localização geográfica e costumes sociais. *Tinea corporis* e *tinea unguium* atingem 20-25% da população mundial, tornando os dermatofitos a quarta causa de infecções em humanos no mundo (ZHAN; LIU, 2017).

A origem dos dermatofitos recebe a classificação de acordo com a origem como geofílicos (encontrados naturalmente no solo), antropofílicos (encontrados naturalmente nos seres humano) e o zoofílico (encontrados naturalmente em animais), além de se dividirem em três principais gêneros de fungos, *Trichophyton*, *Epidermofiton* e *Microsporum*. Uma das principais formas de contaminação é a inter-humano, causada pelo contato entre pessoas, de forma que uma delas esteja com o microrganismo, além de objetos contaminados, solo e o contato com animais, como cão e gato, por algum agente zoofílico (GNAT et al., 2019).

Esses fungos dermatofíticos possuem frequência e distribuição dependentes de fatores etiológicos como condições climáticas, regiões geográficas, padrão de migração populacional, fatores culturais e nível socioeconômico. Regiões tropicais e subtropicais, possuem uma maior incidência dessas micoses por causa do clima quente e úmido, que é propício para o desenvolvimento dos fungos (SANGUINO; JARROS; NEGRI, 2019).

Pacientes com imunodeficiência causada ou não por Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), deficiência CARD9 autossômica recessiva, podem sofrer de infecções

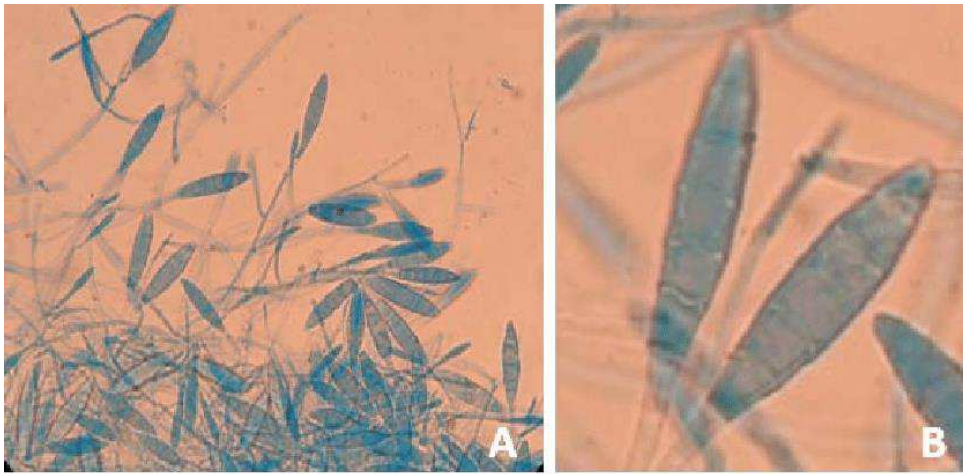
profundas e generalizadas, já que seu sistema de defesa se encontra fragilizado. Essas infecções podem ser apenas superficiais, mas também podem ser invasivas, dependendo das condições dos indivíduos e do seu estado de saúde, podem infectar pessoas de ambos os sexos, raças e idades, o que as tornam complicadas de se combater e bastante apta a se adaptar em diferentes condições (ROUZAUD; LANTERNIER; PUEL, 2017).

Agentes antropofílicos como *T. rubrum*, *T. interdigitale* e *T. tonsurans* e zoofílicos como *T. metagrophytes* e *M. canis*. Das espécies conhecidas e catalogadas, a *T. rubrum* é a mais frequente em *tinea pedis* e *tinea corporis*, além de ser o principal fungo dermatofílico causador de micoses no Brasil, já *M. canis* e *N. gypsea* estão presentes de forma dominante em *tinea capitis*, no país, juntos representam mais de 90% dos patógenos identificados em dermatofitoses (DE OLIVEIRA PEREIRA et al., 2021). Como opções de tratamento a utilização de pomadas ou cremes com cetoconazol, terbinafina e fluconazol em sua composição (GNAT; ŁAGOWSKI; NOWAKIEWICZ, 2020).

3.2 Características dos dermatófitos *T. rubrum*, *M. canis* e *N. gypsea*

N. gypsea (figura 1) é um fungo geofílico que pode ser transmitido por meio do contato de humanos e animais com o solo. Apesar de não ser responsável por causar uma grande quantidade de casos de micoses em humanos, merece uma atenção especial, pois é o principal dermatófito geofílico responsável por infecções, e caso tratado de forma errônea e banal, pode ser capaz de causar infecções graves na pele, além de ser responsável por gerar casos de micoses por todo o mundo, como reações inflamatórias por todo o corpo, as vezes lesões e vesículas eritematosas (NEVES et al., 2018). No Brasil, já foram feitas pesquisas envolvendo amostras de diversos parques do município de São Paulo que identificaram a presença do *N. gypsea*, além de alguns casos de infecção, além de casos de infecção em crianças na cidade de Porto Alegre (SOUZA et al., 2016; MARTINEZROSSI et al., 2017).

Figura 1: Imagem de microscopia ótica de *Nannizzia gypsea*

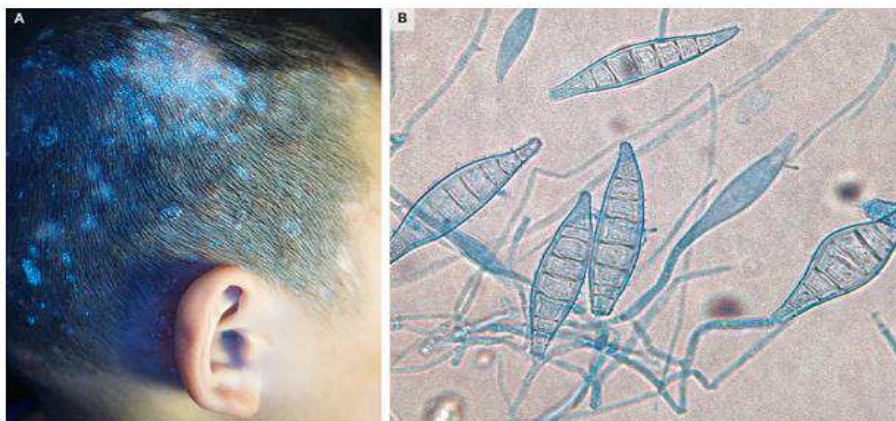


Fonte: <https://www.elsevier.com/pt-br>

A *Tinea capitis* (TC) é uma das infecções zoofílicas encontrada com frequência no Brasil, tendo como principal agente infeccioso o *M. canis*. Suas manifestações clínicas podem se expressar por meio de inflamações ou tonsurantes, de forma que a tonsura seja caracterizada por manchas de alopecia, em sua maioria circulares e de origem pustulosa variável, e por causa do local onde os cabelos quebram próximo ao couro cabeludo, dando o aspecto parecido com o da tonsura (PEIXOTO et al., 2019).

As complicações inflamatórias causadas pelo *M. canis* (figura 2) em humanos podem ser explicada por conta da falta de adaptação do fungo ao humano, que de forma teórica acaba induzindo uma inflamação mais intensa do que as espécies antropofílicas (PEIXOTO et al., 2019). Grande parte dos infectados pelo *M. canis* são crianças e adolescentes devido ao contato com animais já adoecidos, poeira contaminada, escovas ou roupas, ocorrendo principalmente nos Estados Unidos e Brasil (SILVA et al., 2017).

Figura 2: *Microsporium canis*



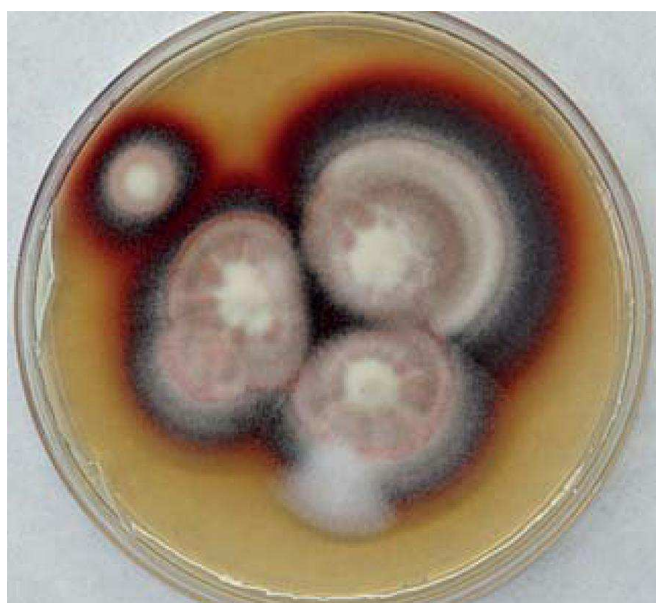
Figuras (A) e (B) referentes ao relato de caso (Ref.1). Tingting Wang, M.B., B.S., Jia-Qi Chen, M.D., Ph.D., Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou, China.

Fonte: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMicm2108047>

O *Trichophyton rubrum* é um fungo que possui em sua morfologia hifas septadas hialinas (figura 3), em sua maioria artrosporadas, possui um tempo de crescimento lento quando comparado aos demais dermatófitos, levando em torno de 14 dias para alcançar seu amadurecimento completo. Macroscopicamente tem aspecto aveludado e esbranquiçado, além de ter um tom avermelhado púrpura no reverso de sua colônia (CORDEIRO, et al.,2015). É um fungo antropofílico reconhecido como o principal agente responsável por causar dermatofitoses, principalmente lesões de pele e unhas (PEIXOTO et al., 2019).

Alguns casos de infecção crônica ocasionadas por *T. rubrum* estão sendo atribuídas a falha terapêutica ocasionada fatores de resistência, como a produção de biofilme, já que alguns dermatófitos possuem a capacidade de produzi-lo (COSTA, et al., 2014).

Figura 3: *Trichophyton rubrum* em meio ágar Sabouraud glicose (Difco®).



Fonte: <https://www.scielo.br/j/abd/a/kyBYkpXSnv4YWSxxLRpvhqz/?lang=en>

3.3 Formas de tratamento farmacoterapêutico para as dermatofitoses

Como forma de tratamento, existem uma certa variedade de antifúngicos capazes de atuar no combate e no controle desses fungos, podendo ser de forma tópica ou sistêmica. Entre as várias opções farmacoterapêuticas as mais indicadas são os compostos azólicos como Imidazois, Itraconazol e Fluconazol, além de Terbinafina e Griseofulvina, com cada um tendo suas características e vantagens que podem divergir durante escolha do tratamento e com o tipo de lesão (KHURANA; SARDANA; CHOWDHARY, 2019).

Para que as drogas sistêmicas possam exercer uma ação elas precisam ter a capacidade de atingir o extrato córneo da pele, local onde os dermatófitos encontram-se, o que torna essa característica de extrema importância para um fármaco com essa aplicação (KHURANA; SARDANA; CHOWDHARY, 2019).

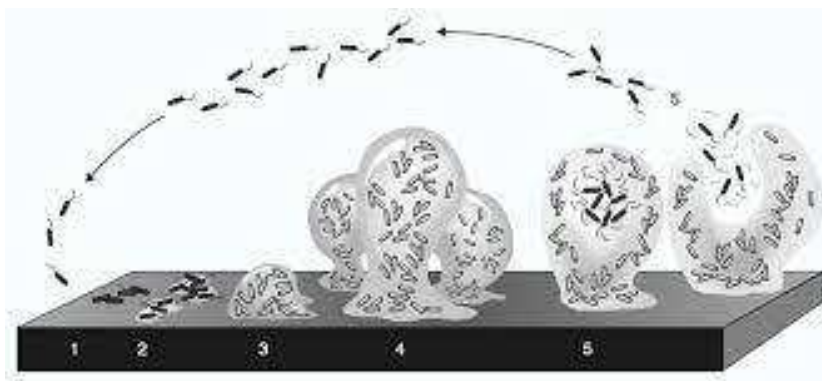
Cada antifúngico terá um mecanismo de ação específico, no entanto, a maioria irá atuar no sistema de síntese do ergosterol, um dos principais componentes da membrana fúngica responsável por diversas funções, como tornar a membrana fluida, além de manter a integridade. Tanto os compostos azólicos (creme ou comprimido), quanto a Terbinafina (creme ou comprimido) e Grizelfuvina (comprimido) atuam inibindo enzimas importantes no processo de geração do ergosterol, como a C-14 desmetilase e a esqualeno epoxidase. Dos fármacos mencionados, o único que não possui um mecanismo de ação bem elucidado é a Griseofulvina, que também é o mais recomendado para tratar *tinea capitis*, por mais que os azóis e a terbinafina sejam mais recomendados para as demais micoses (CAMPOY; ADRIO, 2017).

A *tinea capitis* possui um alto índice de recorrência, o que pode torna-la crônica, além de provocar prejuízos ao tratamento e possivelmente fornecer resistências às poucas alternativas farmacológicas utilizadas nesses casos (KAUL; YADAV; DOGRA, 2017).

3.4 Biofilme e resistência aos antifúngicos

Por mais que existe uma quantidade significativa de antifúngicos para tratar as dermatofitoses, o surgimento de mecanismos de resistência acaba dificultando o combate agentes infecciosos e diminuindo as opções de tratamento. Mecanismos como o efluxo de drogas, que é capaz de jogar o fármaco que se encontra dentro da célula fúngica para fora dela, modificação do alvo farmacológico, responsável por impedir que o fármaco se conecte ao alvo e exerça sua ação, e a formação de biofilmes (figura 4), que fornecem propriedades físicas e metabólicas que protegem o microrganismo do fármaco, já são conhecidos (KHURANA; SARDANA; CHOWDHARY, 2019).

Figura 4: Estágios de formação do biofilme de dermatófitos



Fonte: <https://www.newslab.com.br>

Uma das principais razões para os tratamentos de dermatofitoses durarem tempos é a formação de biofilme, formado por um conjunto de células dematofíticas aglomeradas em uma matriz de superfície biológica ou não biológica. Essa forma de adaptação e resistência protege as células de ambientes estressantes, como o sistema de defesa do organismo em que estão habitando e medicamentos, e permitem que elas comuniquem-se trocando materiais internos entre si, como proteínas e até mesmo material genético de resistência a ameaças (LIN et al., 2019).

Devido ao crescente número de resistências fúngicas aparentes nos últimos anos e as dificuldades proporcionadas por eles, a medicina atual acaba tendo que buscar novas alternativas de combater esses sistemas de defesas para que ainda seja possível combater as infecções fúngicas e proporcionar a cura para os pacientes. Dessa forma, mostra-se necessários a buscas por novos agentes farmacológicos que forneçam alternativas para o tratamento das dermatofitoses e que possam superar essas barreiras geradas pelo sistema de defesa fúngico (LIN et al., 2019).

3.5 Riparinas

Estudos realizados por Barbosa-filho e colaboradores (1990) com o isolamento e modificações estruturais em riparinas, originadas da extração feita a partir da *Aniba riparina* (Ness) Mez, mostraram que as moléculas naturais e as sintéticas possuem atividades farmacológicas viáveis e ações variadas, demonstrando um bom potencial. Ao realizar o isolamento, foi obtido quatro modelos naturais de riparinas que tiveram a presença de potencial farmacológica, onde foi detectado a existência de atividade antimicrobiana.

A *A. riparina* (Nees) Mez é a espécie de planta responsável por fornecer as riparinas isoladas, a qual localiza-se em sua maioria na zona Norte do Brasil, onde pode ser conhecida pelos nomes populares de “louro”, “canela de barraco”, “louro-falso-aritu” e “louro-casca-fina” além de alguns países da América do Sul (ROSSI; YOSHIDA; MAIA, 1997). Esses compostos são alcaloides originadas de O-metiltiramina e ácidos benzoicos, raramente encontrados em produtos naturais (BARBOSA-FILHO et al., 1990).

Foram realizadas sínteses com o intuito de modificar a estrutura da N-benzoiltiraminas, onde foi obtido uma molécula capaz de sofrer substituições e fornecer análogos com atividades farmacológicas variadas (BARBOSA-FILHO, 1990). Com a

diversidade de compostos químicos sintetizados, houve a obtenção de compostos com atividade antifúngica e relaxante muscular, tendo possíveis candidatos a antidepressivos e ansiolíticos (CASTELO-BRANCO et al., 2000).

Com diversos estudos investigativos sobre a ação das substâncias sintetizadas e naturais, onde além da atividade antimicrobiana e a de relaxante muscular, foram descobertas outras atividades que essas substâncias possuam como anti-inflamatória, antioxidante, antinociceptiva, antiparasitária, e outra até mesmo com atividade antitumoral (SILVA et al., 2015; SANTIAGO et al., 2015; MAFUD et al., 2018).

Dessa forma, ao observa o extenso potencial farmacológico dessas substâncias, tanto as isoladas quanto as sintéticas, mostra-se necessário continuar com a investigação das possíveis atividades terapêuticas que esses compostos podem possuir, além de elucidar o mecanismo de ação e as relações entre estrutura e atividade relacionados a eles. Assim, é possível que seja investigado a ação desses compostos sobre os fungos dermatofíticos, já que ainda não existe nenhum estudo que relacione a atividade das riparinas naturais e sintéticas contra os dermatófitos, com o intuito de buscar uma nova alternativa de tratamento para esse tipo de micose.

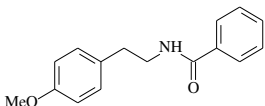
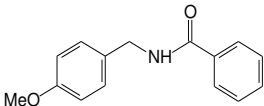
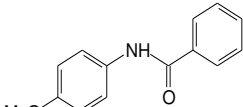
4 METODOLOGIA

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica do Centro de Educação e Saúde (UFCG) que conta com estrutura disponível suficiente para o desenvolvimento do trabalho. Além deste, contamos com o apoio do Laboratório de Microbiologia do mesmo centro. O trabalho já foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, sob o código: AECBD36.

4.1 Drogas-teste

A riparina natural 1 e os homólogos sintéticos Nor- (Nor-Riparin 1) e Dinor-riaprinas (Dinor-Riparin 1) foram fornecidas pelo grupo de Produtos Naturais e Sintéticos da Universidade Federal da Paraíba (Brasil) (Figura 5). Nós utilizamos terbinafina (Sigma-Aldrich®) como antifúngico convencional. As drogas-teste foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídas em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®) para obter a concentração inicial de 1024 µg/mL. A concentração máxima de DMSO utilizada foi de 0,5%. A partir desta concentração, são feitas diluições seriadas em meio RPMI 1640 para alcançar concentrações inferiores.

Figura 5: Riparinas naturais e homólogos sintéticos

RIPARINA 1
 C₁₆H₁₇NO₂
NOR- E DINOR-RIPARINAS
Nor-Riparin 1  C₁₅H₁₅NO₂
Dinor-Riparina 1  C₁₄H₁₃NO₂

4.2 Fungos

Utilizamos as seguintes linhagens fúngicas para os ensaios de atividade antifúngica : *T. rubrum* ATCC 28188; *T. rubrum* LM 03, *T. rubrum* LM 06, *T. rubrum* LM 63, *T. rubrum* LM 70, *T. rubrum* LM 176, *M. canis* ATCC 36295, *M. canis* LM 177 (Couro cabeludo), *M. canis* LM 186 (Braço), *M. canis* LM 216 (Couro cabeludo), *M. canis* LM 232 (Pés) e *M. canis* LM 665 (Cabeça), *Nannizzia gypsea* ATCC-24102, *N. gypsea* LM-5 (isolada de unha do pé), *N. gypsea* LM 129 (isolada de pernas), *N. gypsea* LM-130 (isolada de pernas), *N. gypsea* LM-

184 (isolada de pés), *N. gypsea* LM-305 (isolada de pés), obtidas da coleção do Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal da Paraíba (Brasil). As cepas fúngicas foram cultivadas em ágar batata glicose (Difco®) a 28°C por até 7 dias. As recentes colônias fúngicas foram cobertas com solução salina estéril (NaCl 0,9 %) e agitadas levemente. As densidades das suspensões de cada cepa foram ajustadas em espectrofotômetro a 520 nm para um valor de 70-72% de transmitância, a qual corresponde a um inóculo de aproximadamente 1×10^6 UFC/mL (SANTOS; BARROS; HAMDAN, 2006). Posteriormente, cada inóculo foi diluído em meio RPMI 1640 para obter a concentração final de $0,4 \times 10^4$ a 5×10^4 UFC/mL (CLSI, 2017).

4.3 Ensaio da atividade antifúngica das riparinas

4.3.1 Determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM das drogas-teste foi realizada pela técnica de microdiluição (CLSI, 2017). Em cada linha da placa, foram adicionados 100 µL das drogas-teste duplamente concentradas e diluídas 1:2 de uma cavidade para a outra em RPMI 1640. Em cada cavidade da placa, foram adicionados 100 µL do inóculo previamente preparado. Um controle negativo (RPMI 1640 + inóculo) para que fosse confirmado a presença e o crescimento do fungo no meio, um controle com DMSO (DMSO + inóculo + RPMI 1640) foram realizados. As placas foram seladas e incubadas a 28°C por até 7 dias para a realização da leitura. A CIM é definida como a menor concentração das drogas capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico quando comparadas às cavidades do controle.

4.3.2 Determinação de Concentração fungicida mínima (CFM)

Após a determinação da CIM, alíquotas de 10 µL foram retirados de cada poço em concentrações maiores que a CIM e semeadas em placas de ágar Sabouraud glicose (Difco®). As colônias de fungos foram contadas após incubação das placas a 28° por até 7 dias. Foi determinada como CFM, a menor concentração de droga que resultou crescimento de menos de três colônias (99,9% de morte) (DE QUADROS *et al.*, 2011). A droga demonstrou ação fungicida quando a proporção de CFM/CIM não excedeu um valor de 4, enquanto que foi considerada fungistática quando CFM/CIM for maior que 4 (HAZEN, 1998).

4.4 Atividade anti-biofilme da Riparina 1, Nor e Dinor 1

4.4.1 Formação do biofilme de Dermatófitos

O ensaio de formação de biofilme foi realizado em placas de poliestireno com 96 poços baseadas no método descrito por Brilhante et al., (2018). Uma alíquota de 100 μL do inóculo fúngico (1×10^6 UFC/mL) foi adicionada nos poços da placa e incubada 37 °C durante 3 horas para pré-adesão do biofilme. Após lavagem com solução salina estéril para retirar as células não-aderentes, alíquotas de 200 μL RPMI 1640 foram adicionadas. As placas foram incubadas a 37°C sem agitação por 72 horas para a formação do biofilme.

Após incubação, o meio de cultura foi removido de cada poço e as placas foram lavadas com solução salina estéril. Após a secagem, 100 μL de solução de cristal de violeta (0,5% em etanol) foi adicionado a cada poço e incubados por 20 min. As placas foram lavadas com solução salina estéril duas vezes e os biofilmes foram descoloridos pela adição de 100 μL de etanol a 95%. Finalmente, a solução de cada poço foi lida a um comprimento de onda de 570 nm (COSTA-ORLANDI et al., 2014).

Com base nesses resultados, conseguimos classificar cada cepa em diferentes graus de produção de biofilme. O valor de corte da densidade óptica (DO) para o teste foi definido em relação aos valores do controle negativo (sem biofilme, apenas RPMI 1640). O valor de corte (DOc) foi definido como três desvios padrão acima da DO média 570 nm do controle negativo. As cepas foram classificadas como não produtoras ($DO \leq DOc$), fraca ($DOc < DO \leq 2 \times DOc$), moderada ($2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$) e forte produtora de biofilme ($4 \times DOc < DO$) (CORDEIRO et al., 2015).

4.4.2 Efeitos sobre a formação do biofilme *in vitro*

O experimento anterior foi realizado na presença das drogas-teste. Após o período de pré-adesão, 200 μL RPMI 1640 com as drogas-teste (CIM, 2xCIM, 4xCIM e 8xCIM) foram dispensados nos poços. O meio RPMI 1640 livre de formação de biofilme foi incluído como um controle negativo. As placas foram incubadas a 37°C sem agitação por 72 horas. A quantificação da biomassa do biofilme formado na presença e ausência de drogas foi avaliado por cristal de cristal a 0,5% (ALI et al., 2016). A viabilidade do biofilme foi avaliada por análise das UFC (CHEN et al., 2019). Após a formação do biofilme (72h), 100 μL de solução salina estéril foram adicionados a cada poço, seguido por agitação vigorosa para suspender completamente as células do biofilme. As suspensões foram diluídas 1:10 em solução salina estéril e uma alíquota de 10 μL foi semeada na superfície de uma placa contendo agar Sabouraud glicose. As placas foram incubadas a 28°C por 7 dias para análise das UFC.

4.5 Fragmentos de unhas

As amostras de fragmentos de unhas dos pés saudáveis (sem infecção aparente) foram coletadas de quatro homens adultos (idade mínima 18 anos). O material coletado foi desinfetado com etanol por 15 minutos, secos a 28°C e, por fim, esterilizado em autoclave (1 atm, 120°C, 15 min). O material esterilizado foi mantido em tubos vedados e utilizados nos experimentos.

4.6 Efeitos sobre a formação do biofilme ex vivo

Fragmentos de unhas (2 mm x 2 mm) serão dispensados em poços de placas de 96 poços e cobertas com 50 µL do inóculo fúngico a 28°C por 3 h. Em seguida, 50 µL das drogas-teste (CIM, 2xCIM, 4xCIM e 8xCIM) serão adicionados. Um controle sem adição de drogas e outro sem adição de inóculo e drogas serão realizados. As placas foram incubadas a 28°C por 7 dias. O biofilme foi analisado por microscopia óptica para a visualização do biofilme sobre os fragmentos de unha. A análise ocorrerá em 10 campos de microscopia por cada lâmina e as estruturas serão registradas como fortes (+++), intermediário (++) ,baixo (+) ou ausente (-) (Abdel-Aziz et al., 2020). Além disso, os biofilmes ex vivo serão submetidos à contagem de UFC. As suspensões foram diluídas 1:10 em solução salina estéril e uma alíquota de 10 µL foi semeada na superfície de uma placa contendo agar Sabouraud glicose. As placas serão incubadas a 28°C por 7 dias para análise das UFC (Chen et al., 2019).

4.7 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata. Os valores de CIM e CFM foram expressos como moda e os resultados dos ensaios com biofilmes foram expressos em média ± DP (desvio padrão). Realizamos análise de variância ANOVA para determinar as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos e, quando significativos, foram submetidos ao teste de Tukey. Usamos o intervalo de confiança de 95%. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software R versão 4.1.0, na interface RStudio.

4.8 Comitê de ética

O ensaio ex vivo, utilizando fragmentos de unhas humanas, ocorreu após aprovação deste estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CCS/UFPB), com número de protocolo 0157/11.

5. Resultados

Tabela 1. Valores de MIC e MFC (µg/mL) da riparina 1 e seus homólogos *nor* e *dinor* contra cepas de dermatófitos.

Fungos

Fonte

RIP1

NOR1

		CIM	CFM	CFM/CIM	CIM	CFM	CFM/CIM
<i>Trichophyton</i>	-	256	8192	32	1024	1024	1024
<i>Trichophyton</i>	Couro	256	2048	8	64	64	64
<i>Trichophyton</i>	Cabeludo	256	512	2	128	256	256
<i>Trichophyton</i>	Unhas	512	8192	16	128	128	128
<i>Trichophyton</i>	Couro	512	512	1	64	64	64
<i>Trichophyton</i>	cabeludo	512	2048	4	64	64	64
<i>Trichophyton</i>	Tórax	512	8192	16	128	128	128
<i>Microsporum</i>	-	512	8192	16	>	X	X
<i>Microsporum</i>	Couro	512	8192	16	>	X	X
<i>Microsporum</i>	Cabeludo	512	4096	8	>	X	X
<i>Microsporum</i>	Braços	512	1024	8	>	X	X
<i>Microsporum</i>	Couro	128	1024	8	>	X	X
<i>Microsporum</i>	Cabeludo	1024	8192	8	>	X	X
<i>Microsporum</i>	Pés	1024	8192	8	>	X	X
<i>Microsporum</i>	Couro	512	8192	16	>	X	X
<i>Microsporum</i>	Cabeludo	512	8192	16	>	X	X
<i>Nannizzia</i>	-	>	X	X	>	X	X
<i>Nannizzia</i>	Unhas dos	1024	X	X	>	X	X
<i>Nannizzia</i>	pés	>	X	X	>	X	X
<i>Nannizzia</i>	Pernas	1024	X	X	>	X	X
<i>Nannizzia</i>	Pernas	1024	X	X	>	X	X
<i>Nannizzia</i>	Pernas	1024	X	X	>	X	X
<i>Nannizzia</i>	Pés	1024	X	X	>	X	X
<i>Nannizzia</i>	Pés	>	X	X	>	X	X
<i>Nannizzia</i>	Pés	1024	X	X	>	X	X

Na tabela 1 estão os resultados da atividade antifúngica de RIP1, Nor e Dinor 1, além da TRB que é a droga referência de escolha e a classificação da produção de biofilme que cada cepa foi capaz de gerar.

A quantificação da biomassa do biofilme *in vitro* na presença e ausência de drogas foi expressa em valores de densidade óptica (DO) em 570 nm (Figura 6). Observa-se que RIP1, NOR1 e TRB inibiram significativamente a formação de biofilmes por *T. rubrum* LM03-e *M. canis* LM216 ($p < 0,05$). A média de inibição variou de 70-90% (RIP1) e 43-93% (NOR1) em comparação com o controle. RIP1 e NOR1 mostraram efeitos semelhantes a TERB em MIC ($p > 0,05$).

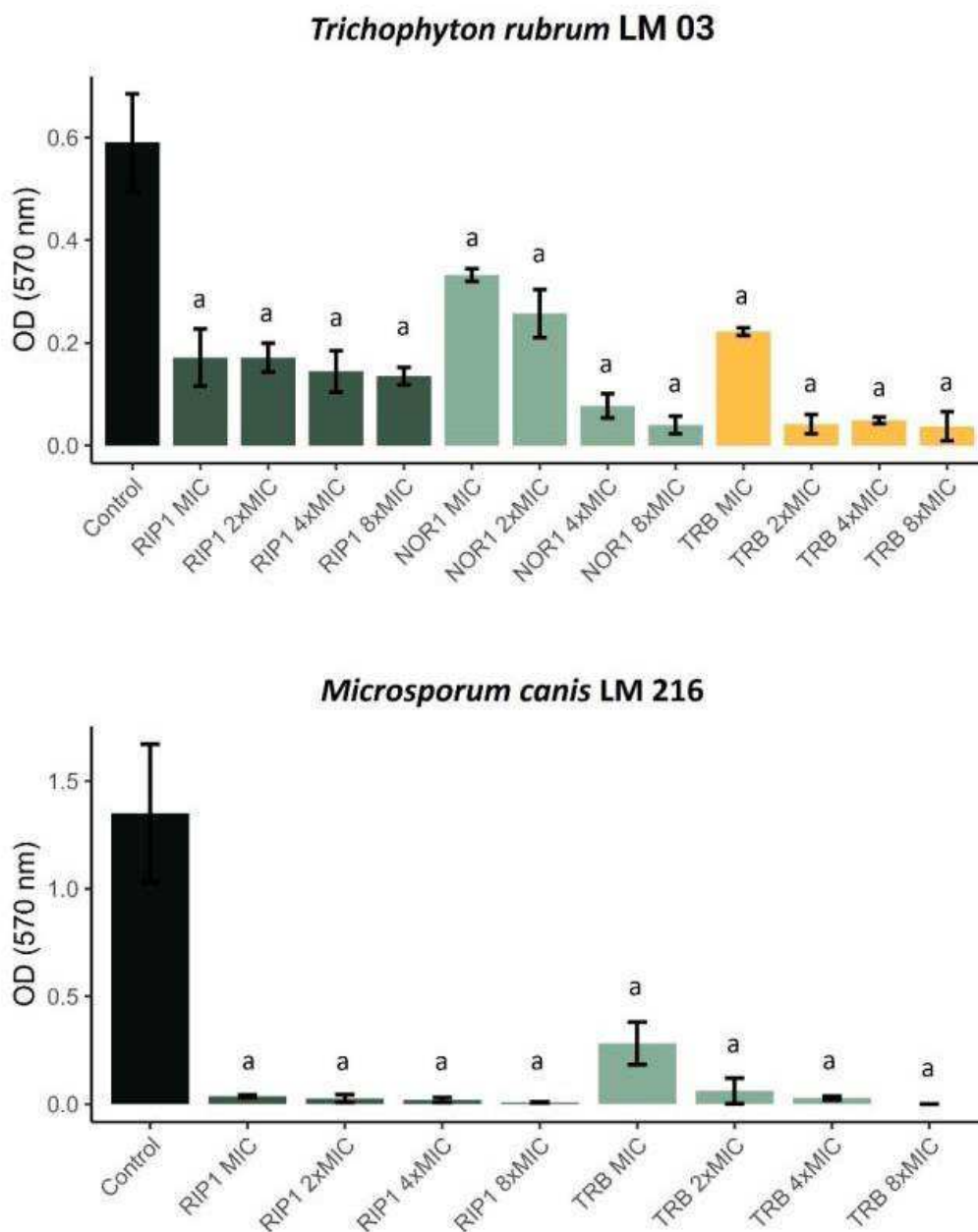


Figura 6. Efeito da riparina 1 e do nor homólogo na produção de biofilme por dermatófitos. Esses resultados expressam a absorbância da coloração de cristal violeta a 570 nm. Os resultados representam as médias \pm DP de três experimentos independentes. Diferença significativa ($p < 0,05$) do controle de crescimento livre de droga- (a). OD, Densidade Óptica; MIC, Concentração inibitória mínima; RIPI, Riparina 1; NOR1, nor-riparina 1; TRB, terbinafina.

A viabilidade do biofilme *in vitro* foi analisada através da determinação de UFC, na qual RIP1, NOR1 e TRB diminuíram expressamente a viabilidade de *T. rubrum* LM 3 ($p < 0,05$). Da mesma maneira, RIP 1 e TRB foram capaz de reduzir a viabilidade do biofilme gerado pelo *M. canis* 3 ($p < 0,05$). De forma geral, a redução média da viabilidade varia de 71-92% (RIP1) e 51-95% (NOR1) em comparação com o controle. A RIPI demonstrou efeitos semelhantes aos do TRB em concentração equivalente à CIM ($p > 0,05$) para ambos os estriados realizados. NOR1 apresentou resultados semelhantes ao TRB em concentrações equivalentes a 4xCIM e 149 8xCIM ($p > 0,05$) contra *T. rubrum* LM03 (figura 7).

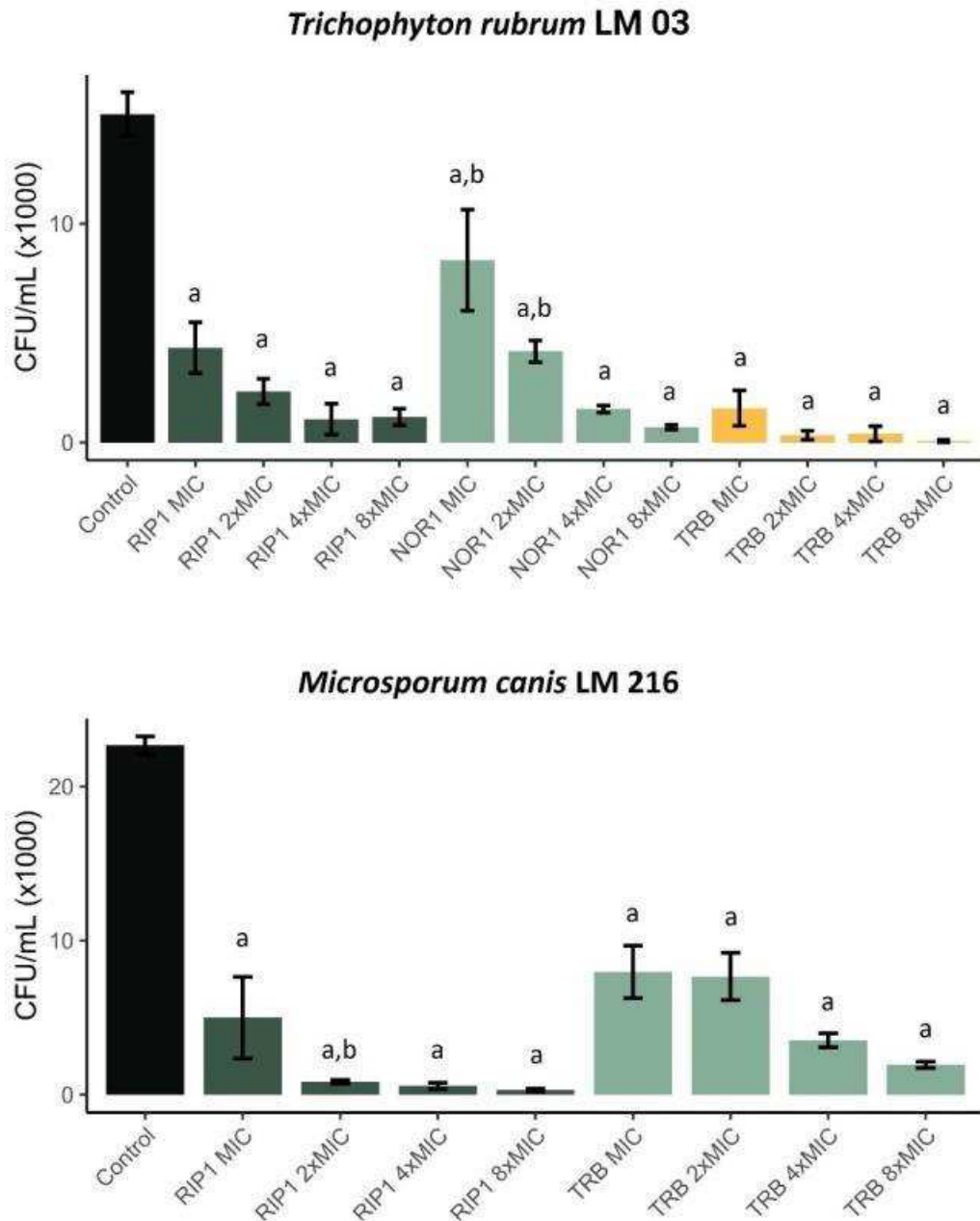


Figura 7. Efeito da riparina 1 e *nor* homóloga na viabilidade de biofilmes *in vitro* de dermatófitos pela quantificação do número de unidades formadoras de colônias (UFC). Os resultados são as médias \pm DP de três experimentos independentes. Diferença significativa ($p < 0,05$) do controle de crescimento livre de drogas (a) e para terbinafina no respectivo valor CIM (b). CIM, Concentração inibitória mínima; RIP1, riparina 1; NOR1, nor-riparina 1; TRB, terbinafina.

A análise do potencial inibitório mínimo de RIP1 e NOR1 na produção de biofilme *ex vivo* de duas formas: por meio da visualização da estrutura sob microscopia de luz (tabela 2) e quantificação do número de UFC (Figura 4). As imagens mostraram que o RIP1, em 4xCIM e 8xCIM, inibiu o crescimento de fungos nos fios de cabelo (Tabela 2). RIP1, NOR1 e TRB reduziram significativamente a viabilidade do biofilme *ex vivo* de *T. rubrum* LM03 ($p < 0,05$)

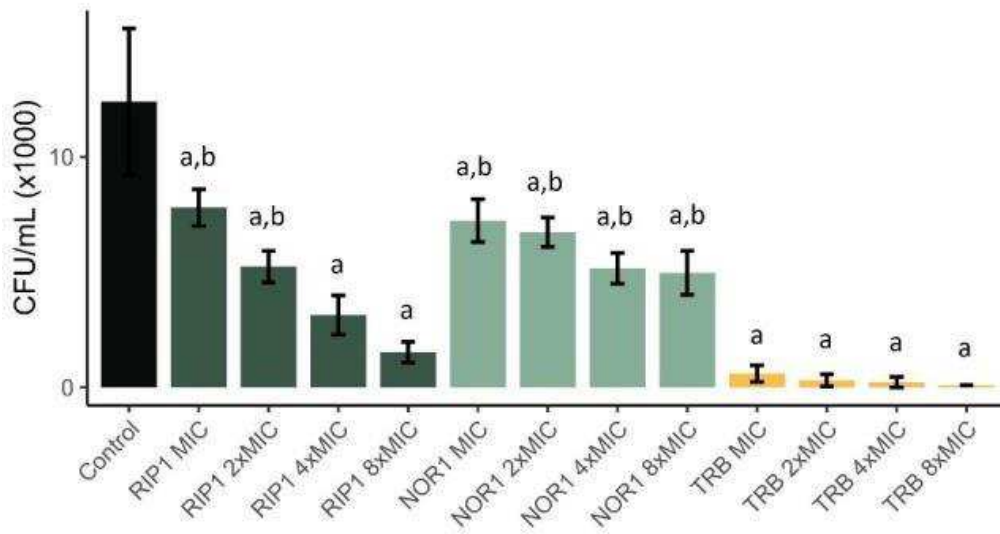
(Figura 4). RIP1 e TRB reduziram a viabilidade do biofilme de *M. canis* LM216 ($p < 0,05$). Entretanto, RIP1 e NOR1 foram menos efetivos que TRB na CIM ($p < 0,05$). Em geral, a redução média da viabilidade variou de 37-2% (RIP1) e 51-66% (NOR1) em relação ao controle.

Tabela 2 – Produção *ex vivo* de biofilme por dermatófitos na ausência (controle) e na presença da RIP1 e do NOR1 homólogo.

Drogas	<i>Trichophyton rubrum</i> LM 03	<i>Microsporum canis</i> LM 216
Control	+++	+++
RIP1 CIM	+	+
RIP1 2xCIM	+	+
RIP1 4xCIM	-	-
RIP1 8xCIM	-	-
NOR1 CIM	+	X
NOR1 2xCIM	+	X
NOR1 4xCIM	-	X
NOR1 8xCIM	-	X
TRB CIM	++	++
TRB 2xCIM	+	+
TRB 4xCIM	-	-
TRB 8xCIM	-	-

CIM, Concentração Inibitória Mínima; RIP1, riparina 1; NOR1, *nor*-riparina 1; TRB, terbinafina. +++ forte; ++ intermediário; + baixo; - ausente. X, não determinado.

Trichophyton rubrum LM 03



Microsporum canis LM 216

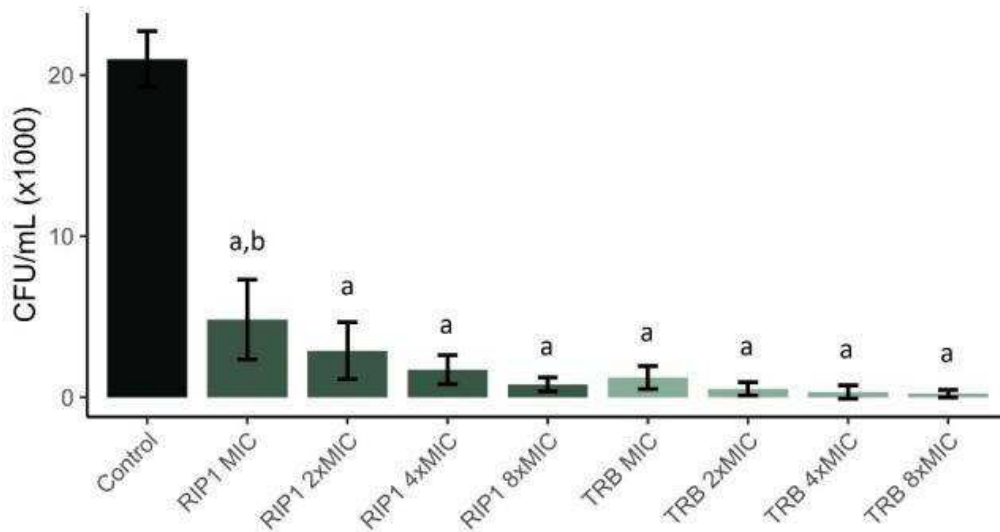


Figura 8. Efeito da riparina 1 e seu homólogo nor sobre a viabilidade de biofilmes ex vivo de dermatófitos pela quantificação do número de unidades formadoras de colônias (UFC). Os resultados são expressos como as médias \pm DP de três experimentos independentes. Uma diferença ($p < 0,05$) do controle de crescimento livre de drogas (a) e da terbinafina no respectivo valor de CIM (b). CIM, concentração inibitória mínima de; RIP1, riparina 1; NOR1, nor-riparina 1; TRB, terbinafina.

6. Discussão

Os compostos RIP1, NOR1 e DINOR1 demonstraram perfis distintos de atividade antifúngica e antibiofilme contra as cepas de dermatófitos avaliadas neste estudo. Os resultados permitem avaliar como a estrutura química pode afetar a ação farmacológica das drogas na formação do biofilme usando *modelos in vitro* (placas de poliestireno) e *ex vivo* (fragmentos de fios de cabelo).

Tanto *T. rubrum*, quanto *M. canis* demonstraram sensibilidade em quando em contato com a Rip1, riparina essa que demonstrou um resultado mais expressivo em relação a Nor e Dinor1. *T. rubrum* apresentou maior sensibilidade a Rip1 e No1, principalmente, ou seja, as riparinas apresentaram efeitos em menores concentrações nesse dermatófito do que nos demais. Ambas as riparinas não demonstraram efetividade quando utilizadas nas cepas do dermatófito *N. gypsea* na concentração utilizada, o que significa que esse dermatófito é menos sensível as riparinas do que os demais.

O uso da homologação como uma estratégia de alteração molecular para o desenvolvimento de drogas representa uma das abordagens distintas para otimizar as relações estrutura-atividade. Assim pode-se deduzir que os homólogos do tipo riparina benzamidas RIP1, NOR1 e DINOR1 podem ser protótipos promissores de drogas antifúngicas contra dermatófitos produtores de biofilme diante dos resultados obtidos. Esses resultados nos permitiram deduzir tendências gerais de estrutura-atividade nestas séries homólogas. Primeiro, a cadeia alquila espaçadora (RIP1 e NOR1) entre os anéis aromáticos está associada à atividade antibiofilme (Figuras 2 e 3) já que ao realizar a alteração da estrutura molecular acabou influenciando na atividade da droga. Em segundo lugar, o espaçador alquil comprimento da cadeia no homólogo RIP1 e NOR1 modulou a atividade antifúngica e espectro de ação (tabela 1). Por fim, a remoção completa da cadeia alquila, conforme observado em DINOR1, não resultou em resultado positivo para a atividade antifúngica (tabela 1).

O comprimento da cadeia alquila pode induzir alterações conformacionais e variar a lipofilicidade nesta série homóloga. Portanto, a maior distância (dois grupos metileno) entre as porções p-metoxifenil e fenilamida nesta série (RIP1) apresentou o espectro de ação mais extenso. A última observação pode estar relacionada a maior lipofilicidade e maior liberdade de conformação em RIP1, que poderia mediar diferentes mecanismos de ação contra os fungos aqui examinados. Em vez disso, quando a distância entre os anéis aromáticos para um

grupo metileno foi encurtada (NOR1), encontramos uma maior seletividade de ação contra *T. rubrum* (tabela 1). Esse achado pode estar relacionado à constrição estérica mais alta ou à perda de lipofilicidade em NOR1 em comparação com RIP1. Essas diferenças podem ser cruciais na modulação do espectro de ação da atividade do antibiofilme.

Uma recente revisão sistemática mostrou que a maioria dos estudos investigando a atividade do antibiofilme em dermatófitos envolvia drogas convencionais. Nesses estudos, as concentrações efetivas das drogas contra biofilmes de dermatófitos foram superiores a CIM (células planctônicas). Os biofilmes são consideravelmente mais resistentes às drogas convencionais e requerem concentrações efetivas mais altas.

A eficácia dos antifúngicos contra dermatófitos depende de vários fatores, incluindo a capacidade de superar fenômenos de resistência fúngica, como biofilmes. Quando os fungos são convertidos de planctônicos em biofilmes, as alterações fenotípicas aumentam a virulência, a cooperação metabólica e a regulação da expressão gênica, levando ao aumento da resistência a agentes antifúngicos e à evasão do sistema imunológico. Além disso, a presença da matriz extracelular limita a eficácia dos antifúngicos, pois representa uma barreira física, além de apresentar mecanismos de sequestro específicos. Uma alternativa que pode ser pensada como forma farmacêutica para aplica a terapia medicamentosa seria em forma de pomada/creme que proporcionaria uma aplicação mais local e não teria que submeter o paciente a um tratamento de forma sistêmica.

Existem estudos limitados *in vitro* e *ex vivo* com dermatófitos visando a busca de novos antifúngicos. Esses fatos justificam novos estudos para a descoberta de novas drogas, mais específicas e menos tóxicas. Para isso, focar em estratégias para eliminar ou inibir biofilmes de dermatófitos representa uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos.

Dados prévios sobre antifúngico e antibiofilme de RIP1 e seus homólogos são raros na literatura. Recentemente, um estudo mostrou que RIP1 tem baixa citotoxicidade, mas não mostrou atividade antimicrobiana e antibiofilme contra *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, o RIP1 mostrou atividade antifúngica contra *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* por ensaio bioautográfico direto *in vitro*.

A falta de informações na literatura sobre a atividade antifúngica e antibiofilme do RIP1 e seus homólogos nos leva a pensar que novos estudos podem complementar nossa proposta do. Com base nos pressupostos encontrados em nossa pesquisa, os mecanismos envolvidos na ação inibitória de biofilmes e modelos farmacológicos que garantem a

segurança e eficácia de RIP1 e NOR1 são uma grande promessa para a aplicação clínica das drogas. Nesse contexto limitado, nossos resultados mostram uma nova perspectiva sobre o potencial antidermatófito de novas drogas porque RIP1 e NOR1 nunca foram avaliados para esse propósito. Em conclusão, apresentamos duas novas drogas com excelente ação antibiofilme contra dermatófitos.

7. Conclusão

Por meio das análises e experimentos realizados com os dermatófitos *T. rubrum*, *M. canis* e *N. gypsea* e as riparinas RIP1, NOR E DINOR1 foi possível determinar qual apresentou efeito e a que se demonstrou mais efetiva em relação ao fungo e o biofilme por ele produzido. Apenas a RIP1 e NOR1 apresentaram resultados promissores, tanto para atividade antifúngica quanto para efeito antibiofilme.

A RIP1 de uma forma geral, foi a que demonstrou um maior espectro, pois apresentou efeito antifúngica promissora contra o *T. rubrum* e *M. canis*, tendo como influência a sua estrutura química. Em contrapartida, a NOR1 apresentou uma maior seletividade, pois com os resultados de CIM e CFM, pode ser observado que a concentração de ambos está menor para o dermatófito *T. rubrum*, o que nós faz deduzir que ao encurtar a cadeia carbônica entre os anéis a acaba ocorrendo uma maior seletividade.

Com os resultados obtidos, é possível observar que as riparinas mostraram-se promissoras ao serem testadas contra o biofilme gerado pelos dermatofitos, o que se torna necessário uma investigação mais aprofundada para que mais duvidas sejam sanadas e esclarecidas. Assim, as riparinas acabam sendo alternativas viáveis na terapia contra dermatófitos formadores de biofilme.

Após todas as pesquisas realizadas, é possível sanar várias dúvidas em relação a atividade das riparinas e suas análogas sintéticas, podendo confirmar suas atividades dermatófitos e demonstrar que elas possuem capacidade de serem mais desenvolvidas e estudadas para que possam ser utilizadas como uma nova alternativa terapêutica contra as dermatofitoses, pois quanto mais o tempo passa novas formas de resistências são desenvolvidas pelos microrganismos, o que como consequência acaba exigindo que novas alternativas terapêuticas.

8. REFERÊNCIAS

1. Santos DA, Barros MES, Hamdan JS. Establishing a method of inoculum preparation for susceptibility testing of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. **J Clin Microbiol**. 2006;44(1):98–101.
2. Markantonatou AM, Samaras K, Zachrou E, Vyzantiadis TA. Comparison of Four Methods for the in vitro Susceptibility Testing of Dermatophytes. *Front Microbiol* [Internet]. 2020 Jul 14 [cited 2020 Oct 26];11. Available from: /pmc/articles/PMC7371995/?report=abstract
3. M38-A2 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard-Second Edition. 2008.
4. CLSI C& LSI. M38 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, 3rd Edition [Internet]. 2017 [cited 2020 May 26]. 62 p. Available from: www.clsi.org.
5. de Quadros AU, Bini D, Pereira PAT, Moroni EG, Monteiro MC. Antifungal activity of some cyclooxygenase inhibitors on *Candida albicans*: PGE2-dependent mechanism. **Folia Microbiol (Praha)**. 2011 Jul;56(4):349–52.
6. Hazen KC. Fungicidal versus fungistatic activity of terbinafine and itraconazole: An in vitro comparison. **J Am Acad Dermatol**. 1998;38(5 III).
7. Brilhante RSN, Correia EEM, Guedes GM de M, de Oliveira JS, Castelo-Branco D de SCM, Cordeiro R de A, et al. In vitro activity of azole derivatives and griseofulvin against planktonic and biofilm growth of clinical isolates of dermatophytes. **Mycoses**. 2018 Jul 1;61(7):449–54.
8. Cordeiro R de A, Oliveira JS de, Castelo-Branco D de SCM, Teixeira CEC, Marques FJ de F, Bittencourt PV, et al. *Candida Tropicalis* Isolates Obtained From Veterinary Sources Show Resistance to Azoles and Produce Virulence Factors. **Med Mycol**. 2015;53(2):145–52.
9. Ali I, Satti NK, Dutt P, Prasad R, Khan IA. Hydroxychavicol: A phytochemical targeting cutaneous fungal infections. *Sci Rep*. 2016 Nov 29;6.
10. Chen B, Sun Y, Zhang J, Chen R, Zhong X, Wu X, et al. In vitro evaluation of photodynamic effects against biofilms of dermatophytes involved in onychomycosis. **Front Microbiol**. 2019;10(JUN).
11. Sen S, Borah SN, Kandimalla R, Bora A, Deka S. Sophorolipid Biosurfactant Can Control Cutaneous Dermatophytosis Caused by *Trichophyton mentagrophytes*. **Front**

- Microbiol** [Internet]. 2020 Mar 12 [cited 2020 May 11];11:329. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32226417>
12. BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, E. C.; BHATTACHARYYA, J. Synthesis of several new phenylethylamides of substituted benzoic acids. **Química Nova**, v. 13, n. 4, p 332-334, 1990.
 13. CASTELO-BRANCO, U. V. *et al.* Preliminary pharmacological studies on three benzoyl amides, constituents of *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae). **Acta Farm Bonaerense**, v. 19, p. 197-202, 2000.
 14. DE OLIVEIRA PEREIRA, F. *et al.* The prevalence of dermatophytoses in Brazil: A systematic review. **Journal of Medical Microbiology**, v. 70, n. 3, 2021.
 15. GNAT, S.; ŁAGOWSKI, D.; NOWAKIEWICZ, A. Major challenges and perspectives in the diagnostics and treatment of dermatophyte infections. **Journal of Applied Microbiology**, 2020.
 16. LIN, H. *et al.* The effect of isoflavaspodic acid PB extracted from *Dryopteris fragrans* (L.) Schott on planktonic and biofilm growth of dermatophytes and the possible mechanism of antibiofilm. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 241, 15 set. 2019.
 17. NASCIMENTO, O. A. *et al.* Pharmacological Properties of Riparin IV in Models of Pain and Inflammation. **Molecules**, v. 21, 2016.
 18. PEIXOTO, R. *et al.* Tinea Capitis: Correlation of clinical aspects, findings on direct mycological examination, and agents isolated from fungal culture. **International Journal of Trichology**, v. 11, n. 6, p. 232–235, 1 nov. 2019.
 19. ROUZAUD, C.; LANTERNIER, F.; PUEL, A. Primary immunodeficiencies and dermatophytosis. In: SPRINGER, C. (Ed.). **Immunogenetics of Fungal Diseases**. [s.l.] Springer International Publishing, 2017. p. 121–133.
 20. SANGUINO, T. C.; JARROS, I. C.; NEGRI, M. Occurrence of dermatophytoses in patients from the sistema Único de saúde. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 94, n. 3, p. 293–297, 1 maio 2019.
 21. SILVA, K. V. S. *et al.* Inhibitory effects of linalool on fungal pathogenicity of clinical isolates of *Microsporum canis* and *Microsporum gypseum*. **Mycoses**, v. 60, n. 6, p. 387–393, 2017.
 22. HUBE, B. *et al.* Dermatophytoses and inflammation: The adaptive balance between growth, damage, and survival. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 25, n. 1, p. e44–e58, 1 mar. 2015.
 23. ZHAN, P.; LIU, W. The Changing Face of Dermatophytic Infections Worldwide.

- Mycopathologia**, v. 182, n. 1–2, p. 77–86, 1 fev. 2017.
24. CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 86–96, 2017. DE OLIVEIRA PEREIRA, F. et al. The prevalence of dermatophytoses in Brazil: A systematic review. **Journal of Medical Microbiology**, v. 70, n. 3, 2021.
 25. GNAT, S. et al. Host- and pathogen-dependent susceptibility and predisposition to dermatophytosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 823–836, 1 jun. 2019.
 26. NEVES, J. J. A; PAULINO, A. O; VIEIRA, R. G; NISHIDA, E. K; COUTINHO, S. D. A. The presence of dermatophytes in infected pets and their household environment. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.70, p. 1747-1753, 2018.
 27. SOUZA, B.S; et al.Dermatophytosis caused by *Microsporum gypseum* in infants: report of four cases and review of the literature. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 91, p. 823-825, 2016.
 28. MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T. A.; ROSSI, A. Pathogenesis of dermatophytosis: sensing the host tissue. *Mycopathologia*, v. 182, p. 215-227, 2017
 29. CORDEIRO, L. V. Perfil Epidemiológico de Dermatofitoses Superficiais em Pacientes Atendidos em um Laboratório da Rede Privada de João Pessoa-PB. **Monografia** (Graduação) – UFPB/CCS, - João Pessoa, 2015.
 30. COSTA, C. O., SARDI J.; SANTOS C.; FUSCO, A. A.; MENDES, G. M.J.S.; In vitro characterization of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* biofilms, *Biofouling* 30 (2014) 719–727.