

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
BACHARELADO EM FARMÁCIA**

MARCELO ANTÔNIO NÓBREGA DA ROCHA

**ATIVIDADE ANTIBIOFILME *in vitro* E *ex vivo* DE RIPARINA
2 E SEUS HOMÓLOGOS NOR- 2 E DINOR- 2 CONTRA
DERMATÓFITOS**

Cuité – PB

2022

MARCELO ANTÔNIO NÓBREGA DA ROCHA

**ATIVIDADE ANTIBIOFILME *in vitro* E *ex vivo* DA RIPARINA
2 E SEUS HOMÓLOGOS NOR- 2 E DINOR- 2 CONTRA
DERMATÓFITOS**

Trabalho de Conclusão do Curso,
apresentado para obtenção do grau de
farmacêutico no curso de farmácia da
Universidade Federal de Campina
Grande

Orientador: Prof. Dr. Fillipe de
Oliveira Pereira

Cuité – PB

2022

R672a Rocha, Marcelo Antônio Nóbrega da.

Atividade antibiofilme *in vitro* e *ex vivo* da riparina 2 e seus homólogos nor- 2 e dinor- 2 contra dermatófitos. / Marcelo Antônio Nóbrega da Rocha. – Cuité: CES, 2022.

41 fl.: il.: color.

Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Graduação em Farmácia) – Centro de Educação e Saúde / CES, 2022.

“Orientação: Prof. Fillipe de Oliveira Pereira.”
Referências.

1. Micologia. 2. Dermatofitose. 3. Doença fúngica. 4. Dermatófitos. 5. Cetaconazol – tratamento - dermatofitose. 6. Itraconazol – tratamento - dermatofitose. 7. Terbinafina – tratamento - dermatofitose. 8. Dermatófitos – atividade antibiofilme. 9. Fungicida. 10. Antifúngico. I. Pereira, Fillipe de Oliveira.
II. Título.

CDU 633.88(043)

MARCELO ANTÔNIO NÓBREGA DA ROCHA

**ATIVIDADE ANTIBIOFILME *IN VITRO* E *EX VIVO* DA
RIPARINA 2 E SEUS HOMÓLOGOS NOR- 2 E DINOR- 2
CONTRA DERMATÓFITOS**

Trabalho de Conclusão de Curso
aprovado pela banca examinadora para
obtenção do grau de farmacêutico, no curso de
farmácia da Universidade Federal de Campina
Grande, UFCG, com linha de pesquisa em
microbiologia

Aprovado em 13/12/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof. Fillipe de Oliveira Pereira
– Presidente da banca – (UFCG) –
Orientador

Prof. Igara Oliveira Lima –
membro – (UFCG)

Anna Paula de Castro Teixeira
– membro – (UFCG)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho as quatro mulheres da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por ser meu patrono e guardião.

Agradeço a minha avó Fátima Maia por todo esforço dedicado à minha educação, criação, amor incondicional e formação de caráter. A minha bisavó Joana Beatriz, que esteve presente em todas as fases da minha vida até o momento em que entrei na universidade e a orgulhei sendo apresentado por ela como meu bisneto doutor, hoje ela me olha do céu. A minha mãe Monaliza Nóbrega pelo ato divino de me conceber, amar, orientar e aconselhar. A minha irmã Anna Beatriz pelo amor incondicional que me mostra desde que nasceu, pelas conversas, pela confiança que deposita em minhas orientações e pela paciência.

Agradeço ao meu melhor amigo Samuel Costa por ser meu confidente, meu grande duo e ter me dado conselhos e força em todos os momentos até hoje, assim como todos os piratas. Agradeço a Clara Dantas, por ser grande amiga por todas as conversas em momentos difíceis, carinho, viagens, passeios e confiança.

Agradeço a minhas amigas Manuella, Fernanda, Viviane, Darja, Ana Clara e Karol, por terem passado 5 anos de minha graduação ao meu lado todo tempo.

Agradeço ao meu orientador, professor e amigo, Fillipe de Oliveira Pereira por não só me orientar e ensinar, mas por depositar confiança em minhas palavras, esperanças e ter proporcionado um dos objetivos que me motivou a fazer o curso de farmácia que foi ter feito uma pesquisa de bancada na área de microbiologia, vou ser grato para sempre por toda essa experiência.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), aos meus colegas de bancada Risley e Emanuel, e a UFPB, especificamente o grupo de Produtos Naturais e Sintéticos, todos tiveram um papel importante para que eu pudesse escrever esta pesquisa.

Agradeço ao Marcelo Nóbrega criança, por não ser uma moldura do que gostariam que ele fosse, por ter tanta coragem, por ter aguentado tanto, por ter se esforçado e por toda fé depositada em si mesmo e em Deus.

RESUMO

A dermatofitose é uma doença fúngica que acomete a pele, cabelos e unhas por *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* e *Nannizzia gypsea*, principalmente. O tratamento ocorre pela administração de cetoconazol, itraconazol e terbinafina. No entanto, a capacidade dos dermatófitos em desenvolver biofilmes dificulta a terapêutica, visto que prejudica a permeação de fármacos nos tecidos infectados. Então, pesquisa para encontrar novas drogas com antibiofilme de dermatófitos é crucial. Por isso, o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antifúngica da Riparina 2 e seus homólogos sintéticos NOR-2 e DINOR-2 contra o crescimento fúngico de biofilmes de *T. rubrum*, *M. canis* e *N. gypsea*. Para isso, foi utilizada a técnica de microdiluição com o ciclopirox como controle positivo. A quantificação da biomassa do biofilme *in vitro* foi avaliada após coloração com cristal violeta a 0,5%, e a viabilidade do biofilme pela quantificação do número de UFC. O modelo *ex vivo* foi realizado em fragmentos de unhas humanas, que foram avaliados por visualização em microscopia de luz e quantificação do número de UFC (viabilidade). Os compostos RIP2 e NOR-2 apresentaram atividade antifúngica contra cepas de *T. rubrum*, *M. canis* e *N. gypsea*, porém DINOR2 não apresentou atividade antifúngica significativa contra os dermatófitos. Além disso, RIP2 e NOR-2 reduziram significativamente a viabilidade de biofilmes *in vitro* e *ex vivo* ($p < 0,05$). RIP2 foi mais potente que NOR-2, possivelmente devido à distância entre as porções químicas de cadeias nesses compostos. Por tanto, esse estudo pode servir para o direcionamento de pesquisa de compostos com atividade anti-dermatófitos, visto que as moléculas RIP2 e NOR-2 apresentaram-se promissoras quanto à atividade antifúngica e antibiofilme.

Palavras-chave: dermatófitos; riparinas; dermatofitoses; fungicida; antifúngico.

ABSTRACT

Dermatophytosis is a fungal disease that affects the skin, hair and nails mainly by *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* and *Nannizzia gypsea*. Treatment occurs by administering ketoconazole, itraconazole and terbinafine. However, the ability of dermatophytes to develop biofilms makes therapy difficult, as it impairs the permeation of drugs in infected tissues. So, research to find new anti-dermatophyte biofilm drugs is crucial. Therefore, the aim of this study was to evaluate the antifungal activity of Riparin 2 and its synthetic counterparts NOR-2 and DINOR-2 against the fungal growth of biofilms of *T. rubrum*, *M. canis* and *N. gypsea*. For this, the microdilution technique was used with ciclopirox as a positive control. The quantification of *in vitro* biofilm biomass was evaluated after staining with 0.5% crystal violet, and the viability of the biofilm by quantification of the CFU number. The *ex vivo* model was performed on fragments of human nails, which were evaluated by visualization in light microscopy and quantification of the CFU number (viability). The compounds RIP2 and NOR-2 showed antifungal activity against strains of *T. rubrum*, *M. canis* and *N. gypsea*, but DINOR2 did not show significant antifungal activity against dermatophytes. Furthermore, RIP2 and NOR-2 significantly reduced the viability of biofilms *in vitro* and *ex vivo* ($p < 0.05$). RIP2 was more potent than NOR-2, possibly due to the distance between the chemical chain portions in these compounds. Therefore, this study can serve to direct the research of compounds with anti-dermatophyte activity, since the RIP2 and NOR-2 molecules showed promise in terms of antifungal and antibiofilm activity.

Keywords: dermatophytes; riparins; dermatophytosis; fungicide; antifungal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Riparinas utilizadas no projeto com suas respectivas estruturas químicas e fórmulas moleculares.....	19
Figura 2 Efeito de riparina 2, e homólogos NOR- 2E DINOR- 2 na biomassa de biofilmes de dermatófitos, expresso como absorvância da coloração de cristal violeta.....	29
Figura 3 Efeito de riparina 2, e homólogos NOR- 2 E DINOR-2 na viabilidade de biofilmes <i>in vitro</i> de dermatófitos, quantificando o número de unidades formadoras de colônias (UFC).....	30
Figura 4 Efeito dos homólogos de Riparina 2, NOR-2 e DINOR-2 na viabilidade de biofilmes <i>ex vivo</i> de dermatófitos, quantificando o número de unidades formadoras de colônias (UFC).....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Valores de concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima ($\mu\text{g}/\text{ml}$) de Riparina 2 e homólogos nor2 e dinor2 contra cepas de <i>Trichophyton rubrum</i>	24
Tabela 2 Valores de concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima ($\mu\text{g}/\text{ml}$) de riparina 2 e homólogos nor e dinor contra cepas de <i>Microsporum canis</i>	25
Tabela 3 Valores de concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima ($\mu\text{g}/\text{ml}$) de riparina 2 e homólogos nor e dinor contra cepas de <i>Nannizzia gypsea</i>	26
Tabela 4 Valores de concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima ($\mu\text{g}/\text{ml}$) de ciclopirox contra cepas de dermatófitos	26
Tabela 5 Produção <i>ex vivo</i> de biofilme por dermatófitos na ausência (controle) e presença de riparina 2, homólogos de NOR-2 e DINOR-2.	32

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABD	Ágar Batata Dextrose
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CFM	Concentração fungicida mínima
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
NaCl	Cloreto de Sódio
CES	Centro de Educação e Saúde
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CPX	Ciclopirox
UAS	Unidade Acadêmica de Saúde
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
°C	Grau Célsius
mL	Mililitro
µL	Microlitros
µg/mL	Micrograma por Mililitro
µm	Micrômetro
%	Percentual

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVOS GERAIS	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3. REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1 DERMATOFITOSSES E AGENTES ETIOLÓGICOS	14
3.2 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO	15
3.3 RESISTÊNCIA FARMACOLÓGICA E PERSPECTIVA DE NOVAS MOLÉCULAS.	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 RIPARINAS	19
4.2 DERMATÓFITOS	20
4.3 ESTUDOS DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA	20
4.3.1 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	20
4.3.2 CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)	21
4.4 ESTUDOS EM BIOFILMES <i>IN VITRO</i>	21
4.4.1 FORMAÇÃO DO BIOFILME	21
4.4.2 EFEITOS SOBRE A FORMAÇÃO DO BIOFILME <i>IN VITRO</i>	22
4.4.3 ESTUDO SOBRE A FORMAÇÃO DE BIOFILMES <i>EX VIVO</i>	22
4.4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
5 RESULTADOS	24
5.1 ESTUDOS DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA	24
4.2 ESTUDOS EM BIOFILMES <i>IN VITRO</i> : FORMAÇÃO E VIABILIDADE DO BIOFILME	27
4.3 EFEITOS SOBRE A FORMAÇÃO DO BIOFILME <i>EX VIVO</i>	31
6 DISCUSSÃO	34
7 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37
ANEXOS	41

1. INTRODUÇÃO

Dermatofitoses são micoses de ocorrência mundial causadas por agentes denominados dermatófitos, estes que são divididos em sete clados principais com os gêneros *Arthroderma*, *Lophophyton*, *Microsporum*, *Paraphyton*, *Nannizzia*, *Epidermophyton* e *Trichophyton* (DOLENC-VOLJČ; GASPARIČ, 2017; GNAT *et al.*, 2019). Especificamente no Brasil, *tinea unguium* (unhas dos pés e mãos) e *tinea pedis* são as dermatofitoses mais frequentes entre a população (DE OLIVEIRA PEREIRA *et al.*, 2021). Adicionalmente, o Brasil, apresenta grande relevância epidemiológica, devido a sua localização em uma região tropical, onde as condições climáticas são favoráveis para o desenvolvimento dos dermatófitos (DE OLIVEIRA PEREIRA *et al.*, 2021)

Para agir na resolução dessas ocorrências, o arsenal terapêutico disponível para o tratamento de dermatofitoses compõe uma variedade de agentes antifúngicos de uso tópico e/ou sistêmico, dos quais pode-se destacar ciclopirox e terbinafina. Mesmo assim, a resistência crescente à atual estratégia terapêutica, vem proporcionando recidivas na prática clínica (KHURANA; SARDANA; CHOWDHARY, 2019), fato agravado em parte pela capacidade dos dermatófitos de produzir biofilmes (BRILHANTE *et al.*, 2017).

Além disso, nenhuma vacina terapêutica ou imunoterapia adjuvante está disponível para apoiar os cuidados com fungos isso requer confiança em um arsenal limitado de drogas antifúngicas (GOW *et al.*, 2022). Mesmo existindo gamas de tratamentos para dermatofitoses, de tópicos a sistêmicos, os fungos desenvolvem um sistema de defesa biológico conhecido como biofilme, o que resulta em casos de recalcitrância na terapia e é responsável por torná-los mais resistentes ao estresse causado pelos medicamentos (GUPTA; CARVIEL; SHEAR, 2018a). 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).

Como forma de sobreviver ao meio em que se encontra, o micro-organismo tem a capacidade de formar biofilme e, através desse processo, os dermatófitos têm a capacidade de se ligar impermeavelmente a um tecido queratinizado (GUPTA; CARVIEL; SHEAR, 2018). A formação de biofilmes de dermatófitos é entendida como um importante fator de virulência fúngica que pode explicar diversos aspectos clínicos da doença como cronicidade, recorrência e maior resistência às drogas convencionais (BRILHANTE *et al.*, 2017).

Diante desse cenário, a busca por produtos alternativos com atividade antifúngica e antibiofilme para o tratamento das dermatofitoses tem-se mostrado pertinente, havendo como fontes promissoras os produtos naturais, justificada pela abundância de metabólitos secundários (como as alcaloides), que podem ser usados *in natura* ou funcionar como precursores para o desenvolvimento de compostos sintéticos homólogos e análogos (NUNES *et al.*, 2014).

Nesse contexto, inserem-se as riparinas, alcaloides que contêm um grupo amida, isoladas de frutos verdes de *Aniba riparia* (Nees) Mez. (*Lauraceae*), que juntamente aos seus homólogos sintéticos, vem sendo descritos elevado potencial farmacológico, incluindo a ação antimicrobiana (OLIVEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2020b). Apesar disso, a atividade antifúngica contra *T. rubrum* ainda não foi explorada.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar o potencial antifúngico de riparinas naturais 2, nor- 2 e dinor- 2 contra cepas de *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* e *Nannizzia gypsea*

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima e a concentração fungicida mínima das Riparinas naturais 2 e sintéticas.
- Avaliar o potencial antibiofilme *in vitro* e *ex vivo* (inibição e erradicação) das drogas-teste contra cepas de *T. rubrum* *M. canis* e *N. gypsea* formadoras de biofilme.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Dermatofitoses e agentes etiológicos

As infecções dermatófitas causadas por dermatófitos, um grupo de fungos que possuem filia por tecidos queratinizados, causando diversos tipos de infecções patogênicas e são clinicamente referidas como '*tinea*', com base no tipo e local da infecção, tais como *tinea capitis* (couro cabeludo), *tinea pedis* (pés) e *tinea unguium* (unhas) (KHURANA; SARDANA; CHOWDHARY, 2019b). No Brasil, as principais formas clínicas são *tinea unguium* (unhas dos pés e mãos) e *tinea pedis* (pés) (DE OLIVEIRA PEREIRA *et al.*, 2021).

As dermatofitoses estão entre as causas mais comuns de doenças de pele no mundo e os indivíduos com maior probabilidade de desenvolver dermatofitoses são indivíduos de pele seca, crianças em idade escolar, trabalhadores rurais, atletas, diabéticos e pessoas imunodeficientes (COSTA *et al.*, 2019).

No entanto, as condições ambientais são um forte determinante para a prevalência das dermatofitoses, ambientes úmidos e quentes são favoráveis para o crescimento e a maior disseminação desses fungos, por exemplo, ambientes com clima tropical e subtropical, os quais se classificam países subdesenvolvidos, destacando o Brasil. Além disso, fatores como migrações de pessoas, atividades esportivas, casas de banho, piscinas, estilo de vida, estado imunológico e sanitização local influenciam diretamente na disseminação de dermatofitoses. (SANGUINO; JARROS; NEGRI, 2019).

Recentemente, foi realizada uma análise filogenética usando diferentes marcadores moleculares esclareceu a taxonomia dos dermatófitos. De Hoog *et al.* (2017) distinguiram sete clados principais com os gêneros *Arthroderma*, *Lophophyton*, *Microsporum*, *Paraphyton*, *Nannizzia*, *Epidermophyton* e *Trichophyton*. De acordo com a origem ecológica, *T. rubrum* se classifica como

antropofílico, ou seja, encontra-se restritos aos humanos e raramente infecta os animais (GNAT; ŁAGOWSKI; NOWAKIEWICZ, 2020).

O micro-organismo *T. rubrum* se adapta facilmente a climas e condições úmidas, sendo o dermatofítico mais prevalente no Brasil, sendo as principais formas clínicas *tinea unguium*, *tinea cruris* e *tinea manuum* (DE OLIVEIRA PEREIRA *et al.*, 2021). Em uma pesquisa realizada sobre a frequência relativa de dermatofitoses e espécies de dermatófitos no Brasil, *T. rubrum* ficou na margem de 66% em relação aos outros exemplos de dermatófitos mais prevalentes no Brasil (PEREIRA *et al.*, 2021).

As infecções por *T. rubrum* ocorrem na pele glabra, são em geral inflamatórias e aptas a se tornarem crônicas. São caracterizadas por uma mancha circular, geralmente com descamação e com bordas quase ausentes e a vermelhidão pode ser mínima e as infecções pelo *T. rubrum* podem levar este aspecto com lesões muito crônicas e extensas (BAERT *et al.*, 2019). *Tinea unguium*, quando não tratado de maneira diligente, evolui para uma possível dermatofitose crônica (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020).

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, já que o microrganismo é classificado como zoofílico. Como não são específicas para infectar humanos, ao entrar em contato com a pele seus danos acabam desencadeando uma resposta inflamatória mais intensa do que os fungos antropofílicos (PEIXOTO *et al.*, 2019).

3.2 Tratamento farmacológico

Entre os fármacos atualmente disponíveis para o tratamento de dermatofitose, cetoconazol, itraconazol e terbinafina têm alta adesão de queratina, enquanto é baixa para griseofulvina e fluconazol o que faz com que os três primeiros sejam preferíveis em relação aos dois últimos (KHURANA;

SARDANA; CHOWDHARY, 2019b). No caso dos três primeiros, o cetaconazol pode ser administrado de forma sistêmica e tópica, e o itraconazol apenas sistêmica, ambos mecanismos de ação é devido a inibição de lanosterol 14 α desmetilase, enzima responsável pela síntese de ergosterol. A terbinafina, é um agente antifúngico que inibe a atividade fúngica de forma não competitiva, levando à depleção de ergosterol e acúmulo de esqualeno. Já a griseofulvina possui ação no processo de divisão celular, interferindo na formação de microtúbulos, dificultando o fuso mitótico e o crescimento fúngico (GNAT; ŁAGOWSKI; NOWAKIEWICZ, 2020).

No entanto, os dermatófitos tem facilidade em burlar as defesas inatas do paciente e permanecer como uma infecção residual. Isolados duplicados idênticos geneticamente de *T. rubrum* que levam à doença ungueal crônica permanecem suscetíveis a antifúngicos como itraconazol, terbinafina e fluconazol quando cultivados *in vitro*. Portanto, fatores contribuintes desconhecidos do ambiente ungueal ainda precisam ser elucidados (GUPTA; CARVIEL; SHEAR, 2018b).

3.3 Resistência farmacológica e perspectiva de novas moléculas.

Resistência e recalcitrância são termos comumente usados no contexto de falta de uma resposta clínica em dermatofitoses, especialmente quando se trata de *T. rubrum*. Embora o uso do termo resistência seja mais restrito à falta de inibição *in vitro*, recalcitrância é um termo mais amplo que é mais clinicamente relevante, pois abrange tanto a resistência *in vitro* quanto todas as outras causas possíveis de falha terapêutica (KHURANA; SARDANA; CHOWDHARY, 2019b).

A presença de biofilme é considerada um dos principais fatores que contribuem para a recalcitrância da infecção de dermatofitoses crônicas refratárias aos regimes antifúngicos convencionais (CHEN *et al.*, 2019a). Biofilmes fúngicos fornece uma proteção extra celular para os fungos e resulta em um alto nível de resistência à maioria dos agentes antifúngicos (WU *et al.*, 2017). A formação de biofilme fúngico é um processo de múltiplos estágios que

começa com a adesão microbiana a um substrato, seguida pela proliferação de células fúngicas na superfície e indução da formação de hifas, com subsequente produção de uma matriz extracelular com posterior disseminação de células microbianas. A matriz extracelular é geralmente composta de substâncias poliméricas, como polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, que se acumulam conforme o biofilme amadurece. As vantagens para um organismo de formar um biofilme incluem proteção, sustento e sobrevivência sob condições desfavoráveis condições de um ambiente que sofre ação constante tanto do sistema imunológico quanto de antimicrobianos (PEREIRA, 2021).

Diante disso, como forma de encontrar novas alternativas para tratar infecções microbianas, estudos com compostos da classe de riparinas (N-benzoiltiraminas) vem sendo desenvolvido. São compostos naturais provenientes das Alcamidas que fazem parte de uma classe de alcaloides, e esses compostos são derivados de uma planta encontrada na região amazônica que recebeu o nome de *Aniba riparia* (Nees) Mez. A riparina possui 4 modelos naturais isolados (Riparina I, Riparina II, Riparina III e Riparina IV) e sete homólogos sintéticos nor- e dinor-riparinas (Nor-Riparina I, Nor-Riparina II, Nor-Riparina III, Nor-Riparina IV, Dinor-Riparina I, Dinor-Riparina II, Dinor-Riparina IV), conforme figura 1. Essas riparinas possuem um amplo espectro de atividade biológica, em especial, atividade antimicrobiana. O conceito de “Nor-” e “Dinor-”, é que Nor- serve um prefixo para um análogo estrutural proveniente de um composto-mãe, com a retirada de um carbono, o que resulta em uma diminuição da cadeia de carbonos. O prefixo Dinor- segue a mesma linha de raciocínio, porém, dessa vez ocorre a remoção de dois átomos de carbono, resultando em uma cadeia carbônica ainda menor.

A *A. riparia* (Ness) Mez, contém componentes químicos, como flavonóides, neolignanós, estirilpironas e alcamidas. As moléculas químicas encontradas nas riparinas apresentam importantes efeitos farmacológicos anti-inflamatórios, antimicrobianos e ansiolíticos, além de grande potencial terapêutico (CAMARGO *et al.*, 2018). As propriedades químicas dos produtos naturais, no caso da riparina, contribuem para o desempenho de suas atividades

biológicas, incluindo ação antibacteriana e antifúngica. Devido à diminuição das opções terapêuticas para infecções, analisar a ação antimicrobiana de plantas tornou-se essencial (OLIVEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2020a).

Uma possibilidade de se trabalhar nesse campo de pesquisa é utilizando produtos naturais, que são de grande importância para o desenvolvimento farmacológico, sendo possível desenvolver novos medicamentos (como compostos puros ou extratos), como as riparinas. O crescente impacto das dermatofitoses na sociedade é devido um arsenal muito limitado de agentes antifúngicos e o desenvolvimento de resistência, fazendo-se necessária sempre pesquisas constantes neste campo com intuito de atualizar terapias não mais funcionais e implantar novas terapias (TOUKABRI *et al.*, 2018). Assim, há uma necessidade urgente e não atendida de desenvolver novos inibidores de biofilmes para a prevenção e tratamento de infecções fúngicas associadas ao biofilme (VAN DIJCK *et al.*, 2018).

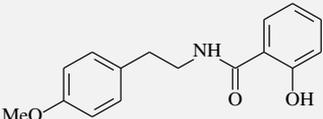
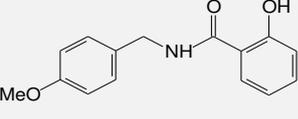
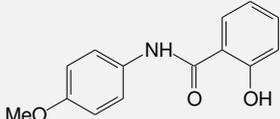
4. MATERIAIS E MÉTODOS

Esse estudo foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica do Centro de Educação e Saúde (UFCG). Também pudemos contar 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 Riparinas

As riparinas naturais (Riparina 1, 2, 3, 4) e os homólogos sintéticos Nor- (Nor-Riparina 1, 2, 3, 4) e Dinor-riaprinas (Dinor-Riparina 1, 2, 4) (Figura 1) foram fornecidas pelo grupo de Produtos Naturais e Sintéticos da Universidade Federal da Paraíba (Brasil). Foi utilizado o ciclopirox (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 e DMSO utilizada foi de 0,5%. A partir desta concentração, são feitas diluições seriadas em meio RPMI-1640 para alcançar concentrações inferiores.

Figura 1: Riparinas utilizadas no projeto com suas respectivas estruturas químicas e fórmulas moleculares.

Riparina II	Nor-Riparina II	Dinor-Riparina II
		
$C_{16}H_{17}NO_3$ O-Benzil-L-Tirosina	$C_{15}H_{15}NO_3$ Ácido [1-metil-5-(4-metilbenzoil) -1H-pirrol-2-il] acético	$C_{14}H_{13}NO_3$ 6-benziloxi-2-nitrotolueno

Fonte: Elaborada pelo autor, 2022

4.2 Dermatofitos

Utilizamos as seguintes linhagens fúngicas para os ensaios de atividade antifúngica: *Trichophyton rubrum* ATCC 28188; *T. rubrum* LM 03, *T. rubrum* LM 06, *T. rubrum* LM 63, *T. rubrum* LM 70, *T. rubrum* LM 176, *Microsporum canis* ATCC 36295, *M. canis* LM 177, *M. canis* LM 186, *M. canis* LM 216, *M. canis* LM 232, *M. canis* LM 665, *Nannizzia gypsea* ATCC-24102, *N. gypsea* LM-5, *N. gypsea* LM-129, *N. gypsea* LM-130, *N. gypsea* LM-184, *N. gypsea* LM-305, 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 (MARKANTONATOU et al., 2020; 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 (“M38-A2 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard-Second Edition”, 2008).

4.3 Estudos de sensibilidade antifúngica

4.3.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima 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 em RPMI 1640. Em cada cavidade da placa, foram adicionados 100 µL do inóculo previamente preparado. Um controle negativo (RPMI 1640 + inóculo), 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 foi definida como a menor concentração das drogas capaz de inibir

visualmente o crescimento fúngico quando comparadas às cavidades do controle.

4.3.2 Concentração fungicida mínima (CFM)

Para a determinação da concentração fungicida mínima, foi realizado o subcultivo de alíquotas de 10 µL foram retirados de dos poços correspondentes a CIM e concentrações superiores e foram semeadas em placas de ágar Sabouraud glicose (Difco®), e foram incubadas à 28°C por até 7 dias. As colônias de fungos foram contadas após o período de incubação—sendo determinada a CFM a menor concentração de droga que resultou crescimento de menos de três colônias (99,9% de morte) (DE QUADROS et al., 2011). Contudo, 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). Os compostos considerados promissores (Riparinas e Terbinafina) foram utilizadas nos ensaios posteriores.

4.4 Estudos em biofilmes *in vitro*

4.4.1 Formação do biofilme

O ensaio de formação de biofilme foi realizado em placas de 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, em seguida, foi adicionado 200 µL RPMI-640 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) foram adicionados a cada poço e incubados por 20 min em estufa a 28 °C. Novamente 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. Foi considerada produtora de biofilme quando o micro-organismo apresentou densidade ótica (DO) superior ao valor de corte (DO_c) (definido como três desvios padrão acima da DO média 570 nm do controle negativo). As cepas foram classificadas como não produtoras ($DO \leq DO_c$), fraca ($DO_c < DO \leq 2 \times DO_c$), moderada ($2 \times DO_c < DO \leq 4 \times DO_c$) e forte produtora de biofilme ($4 \times DO_c < DO$) (CORDEIRO et al., 2015). Nas etapas seguintes, utilizamos a cepa *T. rubrum* LM03 porque foi sensível às drogas e forte produtora de biofilme.

4.4.2 Efeitos sobre a formação do biofilme *in vitro*

O experimento anterior também 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.

4.4.3 Estudo sobre a formação de biofilmes *ex vivo*

Os fragmentos de unha foram coletados e foram desinfetados com etanol por 15 minutos, secos a 28°C e esterilizados em autoclave (1 atm, 120°C, 15

min). O material esterilizado foi mantido em tubos lacrados até a sua utilização nos experimentos. Os fragmentos de unhas (2 mm) foram dispensados em poços de placas de 96 poços e cobertos com 50 μ L do inóculo fúngico a 28°C por três horas. Para verificar o efeito da droga-teste no biofilme *ex vivo*, 50 μ L das diferentes concentrações da drogas-teste foram adicionados (MIC, 2xMIC, 4xMIC e 8xMIC). Foram realizados dois controles: (1) sem drogas e (2) sem inóculo e drogas. As placas foram incubadas a 28°C durante 7 dias. O biofilme foi analisado por microscopia óptica para visualizar o biofilme nos fragmentos de unha. Analisamos 10 campos de microscopia por lâmina e registramos as estruturas como fortes (+++), intermediárias (++) , baixas (+) ou ausentes (-).

Além disso, biofilmes *ex vivo* foram submetidos à contagem de UFC. As suspensões foram diluídas 1:10 em solução salina estéril e 10 μ L foram semeados na superfície de uma placa contendo ágar glicose Sabouraud. As placas foram incubadas a 28°C por sete dias para contagem de UFC. Não detectamos diferenças nas taxas de crescimento entre unhas de diferentes indivíduos.

4.4.4 Aprovação pelo Comitê da Ética e Pesquisa

A pesquisa com unhas humanas foi aprovada pelo comitê de ética e todas as informações pertinentes sobre o processo encontram-se nos anexos do trabalho.

4.4.5 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 \pm 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.

5 RESULTADOS

5.1 Estudos de sensibilidade antifúngica

Na tabela 1, estão expostos os valores de concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima (CIM e CFM) de RIP2 e análogos sintéticos contra cepas de *T. rubrum*. De acordo com a razão dos valores CIM/CFM, todas as drogas foram consideradas fungicidas contra *T. rubrum*. Entre elas, NOR2 foi a de maior destaque pois apresentou menores valores de CIM e CFM. As alterações estruturais de remoção de carbonos trouxeram melhora, NOR e DINOR foram mais ativas.

Tabela 1 – Valores de concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima ($\mu\text{g/mL}$) de Riparina 2 e homólogos nor2 e dinor2 contra cepas de *Trichophyton rubrum*

Fungos	RIP2			NOR2			DINOR2		
	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	MFC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	MFC/ MIC	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	MFC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	MFC/ MIC	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	MFC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	MFC /MIC
<i>ATCC</i>									>
<i>28188</i>	1024	1024	1	1024	1024	1	1024	1024	-
<i>LM03</i>	256	256	1	128	128	1	256	1024	4
<i>LM06</i>	512	512	1	128	128	1	256	1024	4
<i>LM63</i>	1024	1024	1	128	128	1	256	1024	4
<i>LM70</i>	1024	1024	1	128	128	1	256	1024	4
<i>LM176</i>	1024	1024	1	128	128	1	256	1024	4

Fonte: Elaborada pelo autor, 2022

Na tabela 2, RIP2 apresentou atividade fungicida e fungistática contra as cepas de *M. canis*, NOR 2 apresentou apenas atividade fungistática com CIM de 256 $\mu\text{g/mL}$. A cepa LM 216 foi a que demonstrou maior sensibilidade a droga,

com CIM de 128 $\mu\text{g/mL}$ e CFM de 1024 $\mu\text{g/mL}$. DINOR 2 não apresentou atividade antifúngica, pois CIM >1024 ($\mu\text{g/mL}$).

Tabela 2 - Valores de concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima ($\mu\text{g/mL}$) de riparina 2 e homólogos nor e dinor contra cepas de *Microsporium canis*

Fungos	RIP2			NOR2		DINOR2	
	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MFC ($\mu\text{g/mL}$)	MFC/MIC	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MFC ($\mu\text{g/mL}$)	MFC /MIC	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
<i>ATCC36295</i>	256	1024	4	256	>1024	-	>1024
<i>LM177</i>	256	1024	4	256	>1024	-	>1024
<i>LM186</i>	256	512	2	256	>1024	-	>1024
<i>LM216</i>	128	1024	8	256	>1024	-	>1024
<i>LM232</i>	512	512	1	256	>1024	-	>1024
<i>LM665</i>	512	>1024	16	256	>1024	-	>1024

>1024 $\mu\text{g/mL}$: sem atividade nas condições avaliadas. Fonte: Elaborada pelo autor, 2022

RIP 2 na concentração de 512 $\mu\text{g/mL}$ foi fungistática para todas as cepas de *N. gypsea* e com a mesma concentração obteve-se a CFM das cepas LM-129, LM-184 e LM-305. NOR- 2 e DINOR- 2 não apresentaram atividade antifúngica, pois CIM >1024 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 3). Escolhemos as cepas *T. rubrum* LM03 *M. canis* LM216 e *N. gypsea* LM305 para os seguintes ensaios para avaliar os efeitos do RIP 2 NOR- 2 e DINOR- 2 em biofilmes em modelos *in vitro* e *ex vivo*.

Tabela 3 - Valores de concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima ($\mu\text{g/mL}$) de riparina 2 e homólogos nor e dinor contra cepas de *Nannizzia gypsea*.

Fungos	RIP2		CFM/CIM	NOR2	DINOR2
	CIM	CFM		CIM	CIM ($\mu\text{g/mL}$)
	($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)		
<i>ATCC24102</i>	512	>1024	8	>1024	>1024
<i>LM5</i>	512	>1024	16	>1024	>1024
<i>LM129</i>	512	512	1	>1024	>1024
<i>LM130</i>	512	>1024	16	>1024	>1024
<i>LM184</i>	512	512	1	>1024	>1024
<i>LM305</i>	512	512	1	>1024	>1024

>1024 $\mu\text{g/mL}$: sem atividade nas condições avaliadas. Fonte: Elaborada pelo autor, 2022

Na tabela 4, estão expostos os resultados dos ensaios com Ciclopirox (CPX). Os ensaios mostraram que, de fato, CPX é uma droga de escolha para o tratamento antifúngico, com concentrações mínimas baixas o suficiente para inibir o crescimento dos fungos e ser capaz de atuar como fungicida.

Tabela 4 – Valores de concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima ($\mu\text{g/mL}$) de ciclopirox contra cepas de *T. rubrum*.

Fungos	CPX		
	MIC	MFC	MFC/MIC
	($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)	
<i>ATCC28188</i>	1	2	2
<i>LM03</i>	1	2	2
<i>LM06</i>	1	2	2
<i>LM63</i>	1	2	2
<i>LM70</i>	0,5	1	2
<i>LM176</i>	0,5	1	2

>1024 $\mu\text{g/mL}$: sem atividade nas condições avaliadas. Fonte: Elaborada pelo autor, 2022

4.2 Estudos em biofilmes *in vitro*: Formação e viabilidade do biofilme

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 2).

Todas as drogas foram capazes de inibir a formação de biofilme de *T. rubrum* ($p < 0,05$) em relação ao controle. Sendo os valores médios de redução de biomassa de 99% a 36% para RIP2, de 66% a 9% para NOR2 e 76% a 64% de DINOR2. Observamos que RIP 2 inibiu significativamente a formação e biofilmes em concentração de CIM ($p < 0,05$).

Em *M. canis*, assim como em *T. rubrum*, as drogas testes utilizadas foram capazes de exercer atividade na inibição da formação de biomassa fúngica. Sendo os valores médios de redução de biomassa de 99% a 84% para RIP2, de 86% a 79% para NOR2.

RIP 2 apresentou atividade antifúngica para *N. gypsea* ($p < 0,05$) em relação ao controle, porém os valores de CIM mostraram que RIP2 foi menos sensível que CPX. Sendo os valores médios de redução de biomassa de 88% a 46% para RIP2.

Após a análise da produção de biofilme, avaliamos a viabilidade do biofilme *in vitro* por determinação de UFC (Figura 3). Todas as drogas reduziram a viabilidade dos biofilmes ($p < 0,05$) em relação ao controle.

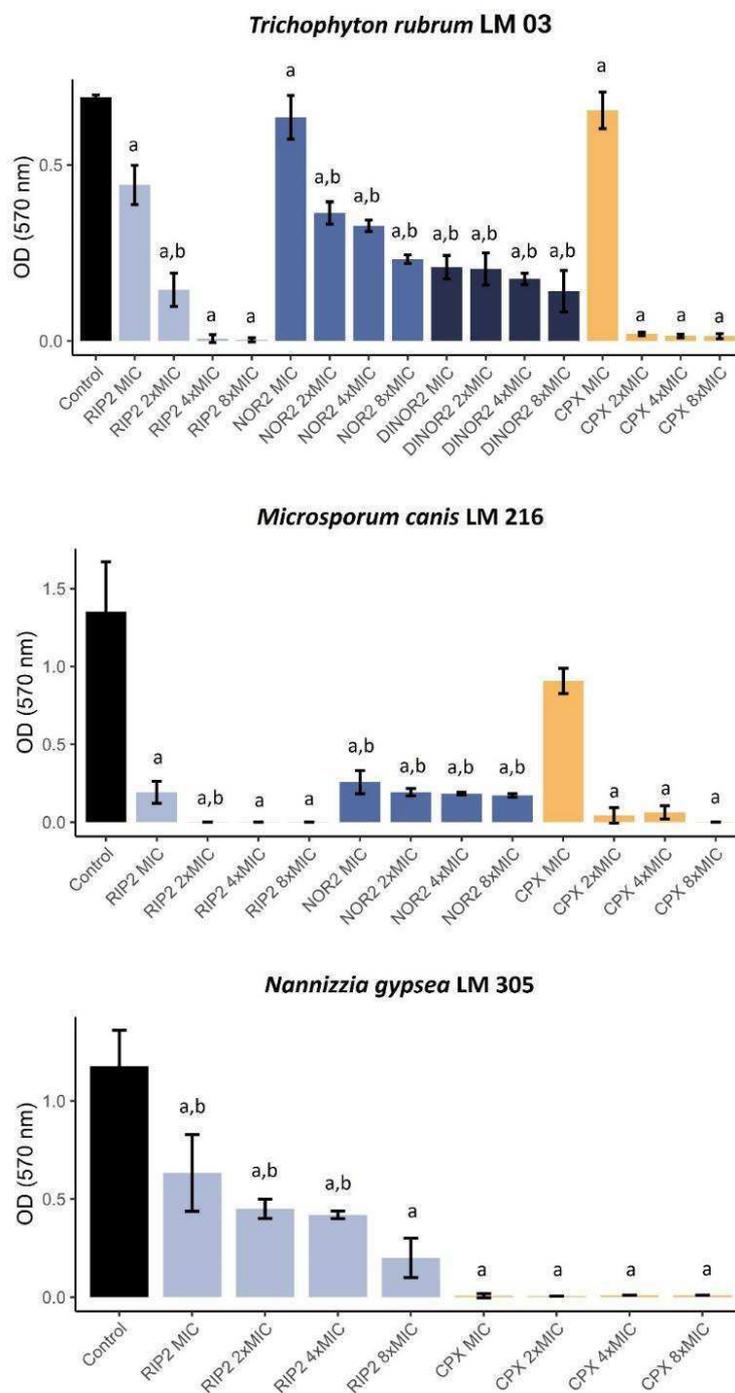
Nas análises com *T. rubrum* os valores de redução da viabilidade foram de 91% a 95% para RIP2, de 67 % a 94% para NOR2 e 73 % a 97% para DINOR2. A atividade antifúngica provocada por CPX foi maior que em RIP2 em concentrações superiores a CIM ($p < 0,05$). Por outro lado, NOR2 e DINOR2 foram semelhantes a CPX, nas respectivas concentrações CIM ($p > 0,05$).

Nos resultados de *M. canis* as duas drogas, RIP 2 e NOR- 2 expressaram atividade na viabilidade dos biofilmes de *M. canis* ($p < 0,05$) em relação ao

controle, inclusive, demonstrando um maior potencial antifúngico em relação ao CPX ($p > 0,005$). Os valores de redução da viabilidade foram de 98% a 92% para RIP2, e NOR- 2 apresentou 99 % a 60% de redução.

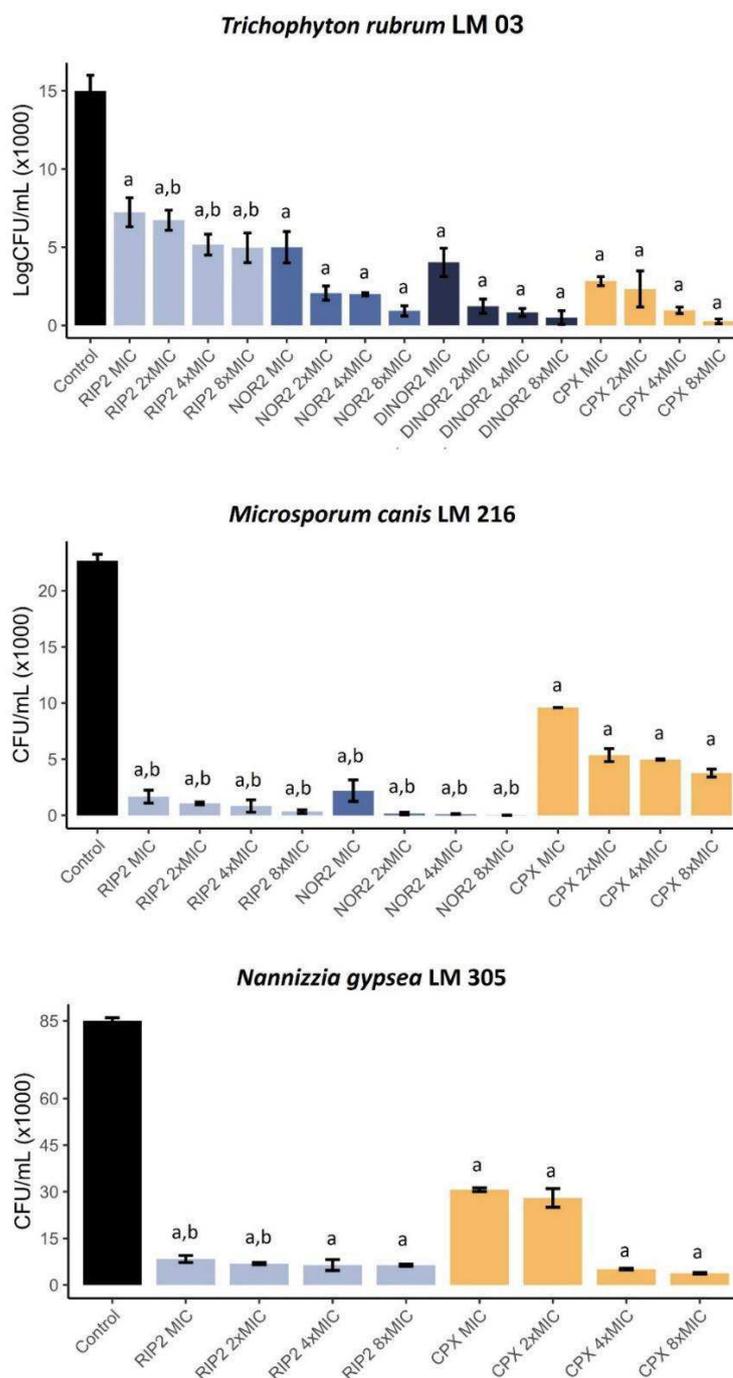
Nannizzia gypsea apresentou valores de 92% a 90% de sensibilidade em relação da viabilidade do biofilme com RIP 2. Os testes resultaram que RIP 2 desempenhou uma atividade antifúngica mais potente que o CPX com uma variação positiva em relação a droga convencional ($p > 0,05$).

Figura 2 - Efeito de riparina 2, e homólogos NOR- 2E DINOR- 2 na biomassa de biofilmes de dermatófitos, expresso como absorvância da coloração de cristal violeta.



Os resultados são as médias \pm DP de três experimentos independentes. Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao controle de crescimento livre de drogas (a) e ao ciclopirox no respectivo valor de CIM (b). CIM, concentração inibitória mínima; RIP2, riparina 2; NOR2, nor-riparina 2; DINOR2, dinor-riparina 2; CPX, ciclopirox. *Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.*

Figura 3: Efeito de riparina 2, e homólogos NOR- 2 E DINOR-2 na viabilidade de biofilmes *in vitro* de dermatófitos, quantificando o número de unidades formadoras de colônias (UFC).



Os resultados são as médias \pm DP de três experimentos independentes. Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao controle de crescimento livre de drogas (a) e ao ciclopirox no respectivo valor de CIM (b). MIC, concentração inibitória mínima; RIP2, riparina 2; NOR2, nor-riparina 2; DINOR2, dinor-riparina 2; CPX, ciclopirox. *Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.*

4.3 Efeitos sobre a formação do biofilme *ex vivo*

Avaliamos o potencial inibitório de RIP2 e NOR-2 na produção de biofilme *ex vivo* de duas formas: visualização das estruturas sob microscopia de luz (Tabela 05) e quantificação do número de UFC (Figura 4).

A tabela mostra que RIP2 4x CIM e 8x CIM inibiu o crescimento das 3 cepas de dermatófitos. NOR-2 teve atividade antifúngica para *T. rubrum* e *M. canis* nas concentrações 4x e 8x CIM. E por fim, DINOR-2 inibiu o crescimento de *T. rubrum* nas concentrações 4x e 8x CIM (Tabela 5).

A imagem (Figura 4) mostra que em relação *T. rubrum*, RIP 2 demonstrou uma alta semelhança de resultados com a droga convencional CPX, inibindo a formação fúngica com baixos valores de CIM ($p > 0,05$) (Figura 4). Os valores de redução da viabilidade foram de 99% a 90% para RIP2, de 97 % a 48% para NOR2 e 98% a 6% para DINOR2. DINOR 2 apenas expressou atividade para *T. rubrum* nas concentrações 4x e 8x CIM, com concentrações superiores a CIM ($p < 0,05$).

M. canis, sofreu ação de RIP2 em todas suas concentrações com concentrações superiores a CIM ($p < 0,05$). E NOR-2 desempenhou inibição da viabilidade nas concentrações 4x e 8x CIM. Os valores de redução da viabilidade foram de 67% a 6% para RIP2, e NOR- 2 apresentou 93 % a 1% de redução.

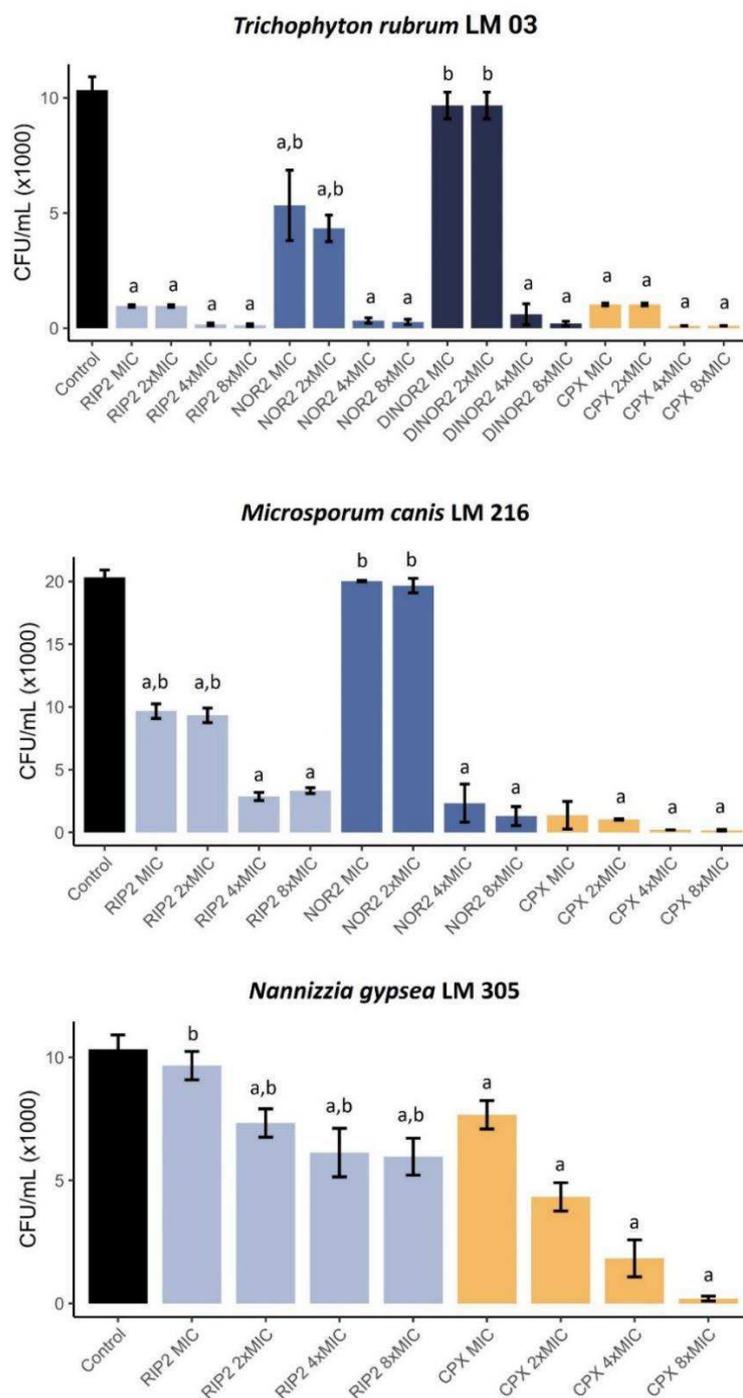
N. gypsea demonstrou sensibilidade a RIP 2 nas concentrações 2x, 4x, e 8x CIM com concentrações superiores a CIM ($p < 0,05$), apresentando valores de atividade na viabilidade do biofilme de 42% a 6%.

Tabela 5 – Produção *ex vivo* de biofilme por dermatófitos na ausência (controle) e presença de riparina 2, homólogos de NOR-2 e DINOR-2.

Drogas	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Microsporum canis</i>	<i>Nannizzia gypsea</i>
	LM 03	LM 216	LM 305
Controle	+++	+++	+++
RIP2 CIM	+	+	+
RIP2 2x CIM	+	+	+
RIP2 4x CIM	-	-	-
RIP2 8x CIM	-	-	-
NOR2 CIM	+	+	X
NOR2 2x CIM	+	+	X
NOR2 4x CIM	-	-	X
NOR2 8x CIM	-	-	X
DINOR2 CIM	+	X	X
DINOR2 2x CIM	+	X	X
DINOR2 4x CIM	-	X	X
DINOR2 8x CIM	-	X	X
CPX CIM	++	++	++
CPX 2x CIM	+	+	+
CPX 4x CIM	-	-	-
CPX 8x CIM	-	-	-

Fonte: Elaborada pelo autor, 2022

Figura 4 - Efeito dos homólogos de Riparina 2, NOR-2 e DINOR-2 na viabilidade de biofilmes *ex vivo* de dermatófitos, quantificando o número de unidades formadoras de colônias (UFC).



Os resultados são as médias \pm DP de três experimentos independentes. Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao controle de crescimento livre de drogas (a) e ao ciclopirox no respectivo valor de CIM (b). MIC, concentração inibitória mínima; RIP2, riparina 2; NOR2, nor-riparina 2; DINOR2, dinor-riparina 2; CPX, ciclopirox. *Fonte: Elaborada pelo autor, 2022*

6 DISCUSSÃO

As moléculas de Riparinas apresentam importantes efeitos farmacológicos anti-inflamatórios, antimicrobianos e ansiolíticos, além de grande potencial terapêutico (CAMARGO et al., 2018). Estudos disponíveis na literatura a respeito da RIP2 discutem os resultados de sensibilidade que as riparinas provocam como potenciais antimicrobianos e anti-inflamatórios, porém, não existe até o momento, estudos da RIP2 envolvendo dermatófitos e biofilmes.

Riparina 2 administrada corretamente, apresenta efeitos sobre o Sistema Nervoso Central, incluindo atividade ansiolítica, antidepressiva e antioxidante, além de anti-inflamatória e anticonceptiva (LOPRES, 2017). Estudos de toxicidade aguda mostraram que a administração da riparina II, por via oral e intraperitoneal, em doses de até 1 g/kg, não causam morte nem letalidade de camundongos dentro de um período de 48hrs (CASTELO-BRANCO *et al.*, 2000).

A respeito da toxicidade, em 2018 foi realizado um teste com RIP 2 em camundongos, foi investigado e detectado que a droga não causou uma mudança significativa no comportamento geral dos camundongos nem nenhum sinal de toxicidade ao longo do período experimental (RODRIGUES DE CARVALHO et al., 2018).

Nesta pesquisa, RIP2 e seus homólogos benzamidas NOR- 2 e DINOR- 2 apresentaram atividades antifúngica e antibiofilme distintas contra os 3 tipos de dermatófitos. A partir dos resultados obtidos, levantam-se interrogações sobre como a variação estrutural das Riparinas 2 em NOR- 2 e DINOR- 2 pode afetar a ação fúngica das drogas farmacologicamente falando em estudos *in vitro* (placas de poliestireno) e *ex vivo* (fragmentos de unha).

O uso da homologação como uma estratégia de alteração molecular no desenvolvimento de fármacos significa uma abordagem para otimizar as relações estrutura-atividade (LIMA; ALVES; AMARAL, 2019). Nossa premissa é que os homólogos do tipo riparina benzamidas RIP2, NOR- 2 e DINOR- 2 podem ser promissores candidatos a protótipos de drogas antifúngicas contra dermatófitos formadores de biofilme. Dessa forma, as investigações farmacológicas de produtos naturais com múltiplas atividades biológicas de

interesse medicinal têm aumentado com a importância no desenvolvimento de fármacos multialvo (NOOR., et al 2022).

Os resultados obtidos nos incentivaram a sugerir tendências de como a estrutura-atividade desses homólogos pode afetar os resultados antifúngicos. Uma possibilidade é que o comprimento da cadeia alquila espaçadora nos homólogos RIP2 e NOR-2 modulou o espectro de ação e atividade antifúngica, e a remoção completa da cadeia alquila resultando em DINOR-2, infelizmente, deferiu em um resultado não tão promissor para a atividade antifúngica (Tabela 2 e 3).

O comprimento da cadeia da RIP2 induz alterações conformacionais em seus homólogos. Essas diferenças podem ser cruciais na modulação do espectro de ação da atividade do antibiofilme.

Encontrar soluções práticas para o tratamento de dermatofitoses, uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na infecção ungueal e permeação de drogas. Nosso estudo tenta superar esse cenário apresentando uma droga candidata no combate ao desenvolvimento de biofilme: RIP2. O presente estudo é a primeira evidência que relata o potencial do RIP2 no controle de biofilmes de dermatófitos.

7 CONCLUSÃO

As Riparinas demonstraram atividade antifúngica em todos os seus 3 tipos, dando destaque a NOR2 que desempenhou atividade antifúngica *in vitro* frente as cepas de *M. canis*, *N. gypsea* e *T. rubrum*, com CIM que variou entre 128 a 1024 µg/mL. Diante das cepas de *T. rubrum*, esse composto apresentou CFM que variou entre 512 a 1024 µg/mL, e pela razão CIM/CFM, pode ser considerada fungicida. As drogas foram capazes de reduzir a formação *in vitro* de biofilmes de todas as cepas ($p < 0,05$) em relação ao controle, com suas singularidades de afinidade para cada cepa com cada riparina, além de conseguirem atuar significativamente na redução da viabilidade dos fungos. O potencial inibitório das riparinas em *ex vivo* foi notório, também, tanto na presença de RIP 2, bem como em seus homólogos, inibindo o crescimento das 3 cepas de dermatófitos. As riparinas foram capazes de reduzir a viabilidade das cepas *in vitro* e *ex vivo*, em valores semelhantes as drogas convencionais, obtendo dessa forma, bons resultados de inibição do biofilme.

Em conclusão, apresentamos três novas drogas com ação antibiofilme contra dermatófitos. Além disso, nossos resultados contribuem para o campo das doenças infecciosas, com destaque para as dermatofitoses, uma das micoses cutâneas mais críticas do mundo, visto que a atividade antidermatofitose de RIP 2, NOR- 2 e DINOR não foi estudada anteriormente.

REFERÊNCIAS

BAERT, F. et al. Updating the Taxonomy of Dermatophytes of the BCCM/IHEM Collection According to the New Standard: A Phylogenetic Approach. **Mycopathologia**, v. 185, n. 1, p. 161–168, 1 fev. 2019.

BRILHANTE, R. S. N. et al. Quantitative and structural analyses of the in vitro and ex vivo biofilm-forming ability of dermatophytes. **Journal of medical microbiology**, v. 66, n. 7, p. 1045–1052, 1 jul. 2017.

CAMARGO, C. R. et al. Spectral and computational features of the binding between riparins and human serum albumin. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 190, p. 81–88, 2018.

CHEN, B. et al. In vitro evaluation of photodynamic effects against biofilms of dermatophytes involved in onychomycosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 1228, 2019.

CLSI, C. & L. S. I. **M38 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, 3rd Edition**. [s.l.: s.n.].

CORDEIRO, R. DE A. et al. Candida Tropicalis Isolates Obtained From Veterinary Sources Show Resistance to Azoles and Produce Virulence Factors. **Medical Mycology**, v. 53, n. 2, p. 145–152, 2015.

COSTA, M. C. et al. Social, environmental and microbiologic aspects of endemic mycoses in Brazil. **New Microbes and New Infections**, v. 29, p. 100496, 2019.

COSTA-ORLANDI, C. B. et al. In vitro characterization of Trichophyton rubrum and T. mentagrophytes biofilms. **Biofouling**, v. 30, n. 6, p. 719–727, 2014.

DE OLIVEIRA, J. C. et al. The Sensitivity Modifying Activity of Nerolidol and α -Bisabolol Against Trichophyton spp. **Indian Journal of Microbiology**, 2020.

DE OLIVEIRA PEREIRA, F. et al. The prevalence of dermatophytoses in Brazil: A systematic review. **Journal of Medical Microbiology**, v. 70, n. 3, 2021.

DE QUADROS, A. U. et al. Antifungal activity of some cyclooxygenase inhibitors on Candida albicans: PGE2-dependent mechanism. **Folia Microbiologica**, v. 56, n. 4, p. 349–352, jul. 2011.

DOLENC-VOLJČ, M.; GASPARIČ, J. Human Infections with *Microsporum gypseum* Complex (*Nannizzia gypsea*) in Slovenia. **Mycopathologia**, v. 182, n. 11–12, p. 1069–1075, 1 dez. 2017.

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.

GNAT, S.; ŁAGOWSKI, D.; NOWAKIEWICZ, A. Major challenges and perspectives in the diagnostics and treatment of dermatophyte infections. **Journal of Applied Microbiology**, 2020.

GOW, N. A. R. et al. **The importance of antimicrobial resistance in medical mycology.** **Nature Communications** Nature Research, , 1 dez. 2022.

GUPTA, A. K.; CARVIEL, J.; SHEAR, N. H. **Antibiofilm Treatment for Onychomycosis and Chronic Fungal Infections.** **Skin Appendage Disorders** S. Karger AG, , 1 ago. 2018a.

GUPTA, A. K.; CARVIEL, J.; SHEAR, N. H. **Antibiofilm Treatment for Onychomycosis and Chronic Fungal Infections.** **Skin Appendage Disorders** S. Karger AG, , 1 ago. 2018b.

HAZEN, K. C. Fungicidal versus fungistatic activity of terbinafine and itraconazole: An in vitro comparison. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 38, n. 5 III, 1998.

KHURANA, A.; SARDANA, K.; CHOWDHARY, A. Antifungal resistance in dermatophytes: Recent trends and therapeutic implications. **Fungal Genetics and Biology**, v. 132, n. May, p. 103255, 2019.

M38-A2 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard-Second Edition. . [s.l: s.n.].

MARKANTONATOU, A. M. et al. Comparison of Four Methods for the in vitro Susceptibility Testing of Dermatophytes. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, jul. 2020.

NUNES, G. B. L. et al. In vitro antioxidant and cytotoxic activity of some synthetic riparin-derived compounds. **Molecules**, v. 19, n. 4, p. 4595–4607, 11 abr. 2014.

OLIVEIRA-JÚNIOR, J. B. et al. Antimicrobial activity and biofilm inhibition of riparins I, II and III and ultrastructural changes in multidrug-resistant bacteria of medical importance. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, p. 104529, 2020a.

OLIVEIRA-JÚNIOR, J. B. et al. Antimicrobial activity and biofilm inhibition of riparins I, II and III and ultrastructural changes in multidrug-resistant bacteria of medical importance. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, p. 104529, 1 dez. 2020b.

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.

PEREIRA, F. D. O. et al. A prevalência de dermatofitoses no Brasil: uma revisão sistemática. 2021.

PEREIRA, F. DE O. A review of recent research on antifungal agents against dermatophyte biofilms. **Medical Mycology**, 8 jan. 2021.

RODRIGUES DE CARVALHO, A. M. et al. Antinociceptive activity of Riparin II from *Aniba riparia*: Further elucidation of the possible mechanisms. **Chemico-Biological Interactions**, v. 287, p. 49–56, 1 maio 2018.

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.

SANTOS, D. A.; BARROS, M. E. S.; HAMDAN, J. S. Establishing a method of inoculum preparation for susceptibility testing of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 98–101, 2006.

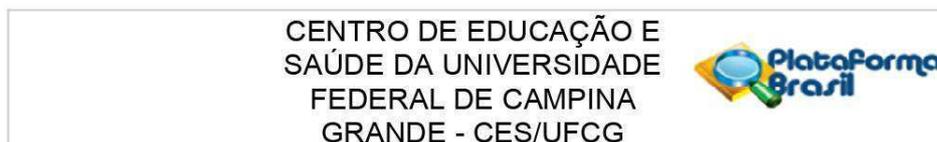
TOUKABRI, N. et al. In vitro biofilms and antifungal susceptibility of dermatophyte and non-dermatophyte moulds involved in foot mycosis. **Mycoses**, v. 61, n. 2, p. 79–87, 1 fev. 2018.

VAN DIJCK, P. et al. **Methodologies for in vitro and in vivo evaluation of efficacy of antifungal and antibiofilm agents and surface coatings against fungal biofilms**. **Microbial Cell** Shared Science Publishers OG, , 1 jul. 2018.

WU, S. et al. Tackling Fungal Resistance by Biofilm Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 6, p. 2193–2211, 23 mar. 2017.

ANEXOS

8 Aprovação pelo Comitê da Ética e Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Atividade antifúngica de riparinas naturais, Nor- e Dinor-riparinas sobre o crescimento e biofilmes de dermatófitos

Pesquisador: Fillipe de Oliveira Pereira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 54436821.0.0000.0154

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.250.773

Apresentação do Projeto:

A pesquisa visa identificar novas potenciais fontes de substâncias antifúngicas, através de testes in vitro e ex vivo, com substâncias antifúngicas de origem natural e seus análogos de origem sintética.

As cepas de fungos, as drogas-teste de origem vegetal e seus análogos sintéticos (fornecidos pela UFPB), os antifúngicos de atividade comprovada já foram adquiridos e o trabalho já foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, sob o código: AECBD36.

O projeto será desenvolvido no Laboratório de Bioquímica do Centro de Educação e Saúde (UFPG) que conta com estrutura disponível suficiente para o desenvolvimento do trabalho em colaboração com o Laboratório de Microbiologia do CES.

Quanto à metodologia, serão realizados os ensaios inibitórios do crescimento e formação de biofilmes in vitro dos dermatófitos descritos no projeto, segundo metodologia apropriada. A segunda parte do trabalho, na qual será necessária a utilização de material humano, os ensaios ex vivo, se darão com fragmentos de unha de indivíduos adultos maiores de 18 anos e fios de cabelo de crianças e adolescentes de até 18 anos de idade, daí a necessidade de apreciação por este comitê e o preenchimento do TALE e do TCLE.

Os experimentos serão realizados em triplicata. Será realizada uma análise estatística dos dados.

Endereço: Rua Profª. Maria Anita Furtado Coelho, S/N, Sítio Olho D'Água da Bica, Bloco: Central de Laboratórios de
Bairro: DISTRITO DE MELO **CEP:** 58.175-000
UF: PB **Município:** CUITE **E-mail:** cep.ces.ufcg@gmail.com
Telefone: (83)3372-1835

**CENTRO DE EDUCAÇÃO E
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE CAMPINA
GRANDE - CES/UFMG**



Continuação do Parecer: 5.250.773

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral:

O pesquisador apresenta como objetivo geral:

- Avaliar o potencial antifúngico e anti-biofilme de riparinas naturais e seus homólogos sintéticos nor- e dinor-riparinas frente as cepas de dermatófitos.

Objetivos específicos:

Em como objetivos específicos o pesquisador cita os pontos abaixo:

- Avaliar a atividade anti-biofilme in vitro (inibição) das drogas-teste contra cepas de *N. gypsea*, *T. rubrum* e *M. canis* formadoras de biofilme;
- Avaliar a atividade anti-biofilme ex vivo (inibição) das drogas-teste contra cepas de *N. gypsea*, *T. rubrum* e *M. canis* formadoras de biofilme.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sobre os riscos:

O pesquisador expõe em todos os documentos apresentados ao comitê que a participação do voluntário, não apresenta riscos, conforme expressos no seguinte trecho: "Os procedimentos empregados para a coleta dos fragmentos de unhas e fios de cabelo não expõem os voluntários a riscos potenciais de contaminação, pois utilizaremos material esterilizado. Usaremos tesoura de pequeno porte (doméstica) para realizar os recortes das extremidades das unhas dos pés e dos fios de cabelo."

Sobre os benefícios:

O pesquisador explicita como benefício do estudo apenas no TCLE e nas informações básicas a seguinte informação:

"O principal benefício do estudo é contribuir com o desenvolvimento de novos medicamentos que poderão servir para tratar dermatofitoses."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O pesquisador apresentou todos os documentos de forma organizada, o projeto está bem escrito e sucinto, mostrando objetivos tangíveis dentro da realidade do Campus onde será executado e

Endereço: Rua Profª. Maria Anita Furtado Coelho, S/N, Sítio Olho D'Água da Bica, Bloco: Central de Laboratórios de
Bairro: DISTRITO DE MELO **CEP:** 58.175-000
UF: PB **Município:** CUITE
Telefone: (83)3372-1835 **E-mail:** cep.ces.ufcg@gmail.com

**CENTRO DE EDUCAÇÃO E
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE CAMPINA
GRANDE - CES/UFMG**



Continuação do Parecer: 5.250.773

utilizando os recursos disponíveis neste local.

Além disso, é de grande importância, uma vez que visa a partir de uma pesquisa de baixo custo e metodologia acessível, disponibilizar resultados que contribuam para a descoberta de novos medicamentos antifúngicos de origem vegetal e similares sintéticos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram apresentados pelo pesquisador, segundo constam na página eletrônica da Plataforma;

- 1) Termo de compromisso do pesquisador, devidamente assinado pelo pesquisador;
- 2) Folha de Rosto, corretamente preenchida e assinada pelo pesquisador e responsável pela instituição proponente;
- 3) Informações básicas do projeto contendo desenho do estudo, cronograma de execução e orçamento (financiamento próprio);
- 4) Termo de Anuência Institucional;
- 5) Projeto detalhado, contemplando todas as etapas estruturais;
- 6) Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE);
- 7) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Recomendações:

Recomenda-se que seja enviado relatório final, após o término do projeto, na Plataforma Brasil.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise dos documentos apresentados e considerando que o pesquisador respondeu as pendências anteriores, este comitê considera o projeto em análise APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1874477.pdf	15/02/2022 09:38:50		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	Projeto.pdf	15/02/2022 09:37:38	Fillipe de Oliveira Pereira	Aceito

Endereço: Rua Profª. Maria Anita Furtado Coelho, S/N, Sítio Olho D'Água da Bica, Bloco: Central de Laboratórios de
Bairro: DISTRITO DE MELO **CEP:** 58.175-000
UF: PB **Município:** CUITE
Telefone: (83)3372-1835 **E-mail:** cep.ces.ufcg@gmail.com

**CENTRO DE EDUCAÇÃO E
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE CAMPINA
GRANDE - CES/UFMG**



Continuação do Parecer: 5.250.773

Investigador	Projeto.pdf	15/02/2022 09:37:38	Fillipe de Oliveira Pereira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	15/02/2022 09:37:16	Fillipe de Oliveira Pereira	Aceito
Outros	CARTARESPOSTA.pdf	15/02/2022 09:37:03	Fillipe de Oliveira Pereira	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoassinada.pdf	15/02/2022 09:09:32	Fillipe de Oliveira Pereira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anuenciaisntitucional.pdf	09/12/2021 16:41:00	Fillipe de Oliveira Pereira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE.pdf	09/12/2021 16:40:37	Fillipe de Oliveira Pereira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termopesquisadorassinado.pdf	09/12/2021 16:39:37	Fillipe de Oliveira Pereira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CUITE, 18 de Fevereiro de 2022

Assinado por:
Glauca Verissimo Faheina Martins
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Profª. Maria Anita Furtado Coelho, S/N, Sítio Olho D'Água da Bica, Bloco: Central de Laboratórios de
Bairro: DISTRITO DE MELO **CEP:** 58.175-000
UF: PB **Município:** CUIATE
Telefone: (83)3372-1835 **E-mail:** cep.ces.ufcg@gmail.com