



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

**EMANUEL PEREIRA SILVA**

**RIPARINA 3 COMO UM NOVO AGENTE ANTIFÚNGICO E  
ANTIBIOFILME PARA CONTROLE DE DERMATÓFITOS**

CUITÉ – PB

2023

**EMANUEL PEREIRA SILVA**

**RIPARINA 3 COMO UM NOVO AGENTE ANTIFÚNGICO E  
ANTIBIOFILME PARA CONTROLE DE DERMATÓFITOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Bacharelado em Farmácia do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande – Campus Cuité, como requisito obrigatório para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira

CUITÉ-PB

2023

S586r Silva, Emanuel Pereira.

Riparina 3 como um novo agente antifúngico e antibiofilme para controle de dermatófitos. / Emanuel Pereira Silva. - Cuité, 2023.  
65 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. Fungos. 2. Infecções fúngicas. 3. Dermatofitoses. 4. Antifúngicos. 5. Biofilme. 6. Sulfito. 7. Riparina 3. I. Pereira, Fillipe de Oliveira. II. Título.

CDU 582.28(043)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE**  
UNIDADE ACADÊMICA DE SAÚDE - CES  
Sítio Olho D'água da Bica, - Bairro Zona Rural, Cuité/PB, CEP 58175-000  
Telefone: (83) 3372-1900 - Email: uas.ces@setor.ufcg.edu.br

## REGISTRO DE PRESENÇA E ASSINATURAS

EMANUEL PEREIRA SILVA

### RIPARINA 3 COMO UM NOVO AGENTE ANTIFÚNGICO E ANTIBIOFILME PARA CONTROLE DE DERMATÓFITOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Farmácia da Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Aprovado em: 18/10/2023.

#### BANCA EXAMINADORA

Prof. Fillipe de Oliveira Pereira

Orientador

Profª Igara de Oliveira Lima

Avaliadora

Prof. Egberto Santos Carmo

Avaliador



Documento assinado eletronicamente por **FILLIPE DE OLIVEIRA PEREIRA, PROFESSOR 3 GRAU**, em 19/10/2023, às 15:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **EGBERTO SANTOS CARMO, PROFESSOR(A) DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 19/10/2023, às 16:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **IGARA OLIVEIRA LIMA, PROFESSOR 3 GRAU**, em 19/10/2023, às 18:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufcg.edu.br/autenticidade>, informando o código verificador **3876516** e o código CRC **74CB345F**.

à minha mãe, que sempre almejou concluir o ensino superior, mas abdicou desse sonho em prol de minha jornada na vida; por isso nada mais justo, a **dedico**.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a **Deus**, por todas as orações atendidas e por estar sempre comigo. Obrigado por me manter firme na caminhada oferecendo-me novas oportunidades a cada amanhecer de novo dia.

Aos meus pais, **Joze Erbenio Pereira** e **Maria da Silva Mendes** (Nelma), que sempre me lembraram da importância de estudar. Obrigado por me proporcionarem tudo que podem e está ao alcance de vocês, principalmente por incentivarem meus estudos desde pequeno e não medirem esforços para prestar suporte a fim de que eu pudesse concluir mais essa etapa da vida. Vocês foram os responsáveis por preparar o caminho e tornar tudo possível, por isso essa conquista não é só minha, e sim nossa. Desejo poder um dia retribuir tudo o que fizeram e fazem por mim. Aos meus irmãos, **Erbenio Filho**, **José Joscanio**, **João Neto** e **Lorena Mendes**, que sempre foram meu referencial de inteligência e inspiração. E a todos os meus familiares que também torceram e acreditaram na concretização de mais um sonho.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. **Fillipe de Oliveira Pereira** com quem tive a honra de aprender sobre fungos e me encantar por eles. Obrigado pela confiança depositada, por ser sempre compreensível e por todos os conhecimentos transmitidos durante a jornada que foram de suma importância para a realização deste trabalho. Tenho imensa admiração pelo profissional competente que és.

A todos os integrantes do Grupo de Pesquisa em Fungos (**FUNGI**), por todos os conhecimentos partilhados e parceria, em especial aos meus companheiros de pesquisa **Risley Nikael**, **Marcelo Nóbrega** e **Gessymara Cainã**, por dividirem comigo a labuta durante os anos de iniciação científica e tornar a rotina no laboratório J08 mais leve. Conjuntamente, agradeço a **Jeyse Rani** que sempre se mostrou prestativa em me ajudar e por ser essa amiga especial de todas as horas.

Ao meu UDC, nominalmente **Alice Alide**, **Beatriz Maria**, **Beatriz Libanio Gessymara Cainã**, **Julhermes Macêdo**, **Livia Gouveia** e **Raylane Bezerra**, que além de amigos da graduação, tornaram-se minha família em Cuité. Obrigado pelas “terapias” coletivas, por me ajudarem nos dias difíceis e em todos os outros, pelas horas de estudo em conjunto, pelos bordões inesquecíveis (paraíso, perfeitos...), até mesmo os conflitos, as crises de riso, e vários momentos incríveis que já me inundam de nostalgia. Vocês serão minha mais preciosa memória de toda a graduação.

Ao meu grande amigo/irmão **Wyllkee Medeiros**, o qual desde o início do curso me dei bem. Obrigado por me estender a mão sempre que precisei, por todo o apoio, consideração, cumplicidade, caronas, pelas ótimas conversas regadas por cafés-da-tarde e por todos os momentos (exceto a final do Argentino e aquele dia no ônibus voltando de João Pessoa).

Aos amigos conquistados no decorrer do curso, em especial **Andry Louhanny**, **Valéria Larissa** (foi pra Araruna, mas deixou saudades), **Hellen Mayara**, **Bianca Taveira**, **Gleddyson César**, **José Neto**, **Yasmin Albuquerque**, **Emily Gadelha**, **Pedro Lucas**, **Júnior Soares**, **Maria Yanka**, **Eloisa Cabral**, **Eduarda Wanderley**, **Ana Lívia**, **Laysa Silva**; dentre outras amizades que fiz na turma de farmácia 2019.1, no curso de férias do HUJB, no GOU e muitos outros amigos de festas, cachaças e noites memoráveis na serrinha.

A minha melhor amiga, **Kauanny Ribeiro**, que apesar da distância permanecemos firmes nos laços da amizade verdadeira. Obrigado por ser essa amiga tão fiel e companheira. Também gostaria de registrar minha gratidão aos demais amigos que construí em Acopiara, em especial **Camila Duarte**, **Larissa Almeida** e **Yandra Rodrigues**, que apesar da vida ter nos proporcionado diferentes caminhos, sei que de longe continuamos torcendo uns pelos outros. Saudades de vocês.

Uma pessoa não poderia ficar de fora destes agradecimentos, **Vera**. Sou grato por ter me acolhido e por ter sido como uma mãe em Cuité durante a trajetória inicial do curso.

A todos os professores que compõem o corpo docente do curso de Farmácia pelos conhecimentos passados e ricas partilhas durante as aulas, em especial **Francinalva Medeiros**, **Vanessa Arruda**, **Igor Santos** e **Karis Barbosa** por semearem em mim o interesse pela ciência.

Aos professores componentes da banca examinadora por aceitarem meu convite e pelo tempo dedicado à análise do trabalho. Ambos, **Egberto Santos** e **Igara Oliveira**, são grandes inspirações para mim.

A Universidade Federal de Campina Grande (**UFCG**), Centro de Educação e Saúde (**CES**), por toda a estrutura disponibilizada que foram essenciais para a minha formação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**), por meio do Programa Institucional Voluntário de Iniciação Científica (**PIVIC**) e

Programa Institucional de Bolsas de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (**PIBITI**).

Por fim, obrigado a todos que de alguma maneira contribuiu, direta ou indiretamente, para a concretização deste sonho. É muito bom nesse quase final de curso, poder olhar para trás e ver o que cada um acrescentou na minha vida. Parafraseando Renato Russo, se tivesse que fazer tudo de novo, eu faria tudo de novo, porque é da minha personalidade. O legal é que eu aprendi.

*E não nos cansemos de fazer o bem, pois no tempo próprio colheremos, se não desanimarmos.*

Galátas 6:9

## RESUMO

As dermatofitoses são infecções fúngicas, com invasão e propagação dos dermatófitos em estruturas queratinizadas. Embora existam diversos medicamentos disponíveis no mercado para o tratamento dessas condições, a resistência aos antifúngicos convencionais vem aumentando e causando falhas terapêuticas. Atualmente a capacidade dos dermatófitos de produzir biofilmes é considerada um dos mais importantes fatores envolvidos nesses processos de falhas no tratamento, pois os biofilmes prejudicam a permeação dos medicamentos nos tecidos infectados. Dessa forma, a pesquisa para encontrar novos agentes antifúngicos com potencial antibiofilme é crucial. Nesse sentido, as riparinas, uma classe de alcaloides que contêm um grupo amida, isoladas dos frutos verdes de *Aniba riparia*, são fitoquímicos promissores. Neste estudo, avaliamos a atividade antifúngica e antibiofilme da riparina 3 (RIP3) e seu homólogo sintético Nor- (NOR3) contra dermatófitos clinicamente relevantes *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* e *Nannizzia gypsea*. Utilizamos o ciclopirox (CPX) como controle positivo. Os efeitos da RIP3 e NOR3 no crescimento fúngico foram avaliados pela técnica de microdiluição. A quantificação da biomassa de biofilme *in vitro* foi realizada por cristal de violeta a 0,5%, e a viabilidade do biofilme foi avaliada quantificando o número de UFC. O modelo *ex vivo* foi realizado em fragmentos de unhas humanas, que foram avaliados por visualização sob microscopia de luz e pela quantificação do número de UFC (viabilidade). Por fim, foi avaliado se as drogas-teste inibem a secreção de sulfito com as cepas que cresceram em meio M9 com L-cisteína, baseado na oxidação do sulfito a sulfato e na medição do sinal estável em 570 nm. Os resultados mostraram que RIP3 é um fungicida, inibindo o crescimento de *T. rubrum* e *M. canis* a partir de 128 mg/L e *N. gypsea* a partir de 256 mg/L. Contrariamente, NOR3 não apresentou atividade antifúngica contra os dermatófitos testados (CIM > 1024 mg/L). Quanto à atividade antibiofilme, RIP3 inibiu a formação e a viabilidade do biofilme *in vitro* e *ex vivo* em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Além disso, RIP3 inibiu significativamente a secreção de sulfito e foi mais potente do que o CPX. Em conclusão, os resultados indicam que RIP3 é um agente antifúngico promissor contra biofilmes de dermatófitos e esta ação parece envolver a inibição da secreção de sulfito.

**Palavras-chave:** riparina 3; antifúngico; biofilme; dermatofitose; sulfito.

## ABSTRACT

Dermatophytoses are fungal infections involving the invasion and propagation of dermatophytes in keratinized structures. Despite the numerous medications available in the market for treating these conditions, resistance to conventional antifungals has been on the rise, leading to therapeutic failures. Currently, the ability of dermatophytes to produce biofilms is considered one of the most important factors involved in treatment failures, as these biofilms hinder the penetration of drugs into infected tissues. Therefore, research aimed at finding new antifungal agents with potential anti-biofilm properties is crucial. In this regard, riparins, a class of alkaloids containing an amide group, isolated from the green fruits of *Aniba riparia*, are promising phytochemicals. In this study, we assessed the antifungal and anti-biofilm activity of riparin 3 (RIP3) and its synthetic counterpart Nor-(NOR3) against clinically relevant dermatophytes *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, and *Nannizzia gypsea*. Cyclopirox (CPX) was used as the positive control. The effects of RIP3 and NOR3 on fungal growth were evaluated using the microdilution technique. The quantification of *in vitro* biofilm biomass was carried out using 0.5% crystal violet, and biofilm viability was assessed by quantifying the number of colony-forming units (CFUs). The *ex vivo* model was performed on human nail fragments, which were evaluated through light microscopy and quantification of CFUs (viability). Finally, it was determined whether the test drugs inhibited the sulfite secretion by strains grown in M9 medium with L-cysteine, based on sulfite oxidation to sulfate and measurement of stable signal at 570 nm. The results showed that RIP3 is a fungicide, inhibiting the growth of *T. rubrum* and *M. canis* from 128 mg/L and *N. gypsea* from 256 mg/L onwards. Conversely, NOR3 showed no antifungal activity against the tested dermatophytes (MIC > 1024 mg/L). Regarding anti-biofilm activity, RIP3 inhibited the *in vitro* and *ex vivo* biofilm formation and viability compared to the control ( $p < 0.05$ ). Furthermore, RIP3 significantly inhibited sulfite secretion and was more potent than CPX. In conclusion, the results indicate that RIP3 is a promising antifungal agent against dermatophyte biofilms, and this action appears to involve the inhibition of sulfite secretion.

**Key words:** riparin 3; antifungal; biofilm; dermatophytosis; sulfite.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Apresentações clínicas das dermatofitoses. ....	19
<b>Figura 2</b> - Antifúngicos atualmente utilizados no tratamento das dermatofitoses e seus alvos celulares. ....	22
<b>Figura 3</b> - Representação ilustrativa das etapas de desenvolvimento do biofilme	25
<b>Figura 4</b> - Estruturas químicas das Riparinas 1, 2 e 3 .....	26
<b>Figura 5</b> - Comparação das estruturas químicas da Riparina 3 e seu homólogo sintético Nor. ....	27
<b>Figura 6</b> - Esquema ilustrativo do procedimento de preparação do inóculo fúngico.	29
<b>Figura 7</b> - Esquema ilustrativo do procedimento da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). ....	30
<b>Figura 8</b> - Esquema ilustrativo do procedimento da determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM). ....	32
<b>Figura 9</b> - Esquema ilustrativo do procedimento para a formação do biofilme <i>in vitro</i> . .....	34
<b>Figura 10</b> - Esquema ilustrativo do procedimento para a quantificação do biofilme <i>in vitro</i> na presença das drogas-teste. ....	35
<b>Figura 11</b> - Esquema ilustrativo do procedimento para avaliar a viabilidade do biofilme <i>in vitro</i> . ....	36
<b>Figura 12</b> - Esquema ilustrativo do procedimento para análise do biofilme <i>ex vivo</i>	37
<b>Figura 13</b> - Esquema ilustrativo do procedimento para avaliar a viabilidade do biofilme <i>ex vivo</i> .....	38
<b>Figura 14</b> - Esquema ilustrativo do procedimento para detecção de sulfito .....	39
<b>Figura 15</b> - Efeito da RIP3 na biomassa do biofilme <i>in vitro</i> de dermatófitos expressa como absorbância da coloração do cristal violeta. ....	43
<b>Figura 16</b> - Efeito da RIP3 na viabilidade de biofilmes <i>in vitro</i> de dermatófitos determinada pela quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC). ....	44
<b>Figura 17</b> - Efeito da RIP3 na viabilidade de biofilmes <i>ex vivo</i> (fragmentos de unha) de dermatófitos determinada pela quantificação do número de unidades formadoras de colônias (UFC). ....	46
<b>Figura 18</b> - Efeito da riparina 3 na formação de sulfito por dermatófitos. ....	47
<b>Figura 19</b> - Representação ilustrativa da degradação de queratina por dermatófitos. .....	52

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Valores de CIM, CFM (mg/L) e razão CFM/CIM da riparina 3, seu homólogo nor- e ciclopirox contra cepas de dermatófitos e a classificação da produção de biofilme de cada cepa.....	41
<b>Tabela 2</b> - Produção <i>ex vivo</i> de biofilme (fragmentos de unhas) por dermatófitos na ausência (controle) e na presença de RIP3.....	45

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Percentual
®	Marca Registrada
>	Maior que
<	Menor que
≤	Menor ou Igual que
°C	Grau Célsius
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
ABD	Ágar Batata Dextrose
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
atm	Pressão Atmosférica
CARD9	Domínio de Recrutamento da Caspase 9
CES	Centro de Educação e Saúde
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
cm	Centímetro
CPX	Ciclopirox
DINOR1	Dinor-Riparina 1
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade Óptica
DOc	Densidade Óptica de Corte
DP	Desvio Padrão
<i>et al.</i>	e Colaboradores
g	Gramas
g/kg	Gramas por Quilograma
g/mL	Gramas por Mililitro
h	Hora
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
LD50	Dose Letal Média

LM	Laboratório de Micologia
MDR	Multidrogas-resistentes
mg/kg	Miligrama por Quilograma
mg/L	Miligrama por Litro
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
NaCl	Cloreto de Sódio
nm	Nanômetro
NOR1	Nor-Riparina 1
NOR3	Nor-Riparina 3
RIP1	Riparina 1
RIP3	Riparina 3
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
S-S	Pontes de Dissulfeto
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônias por mililitro
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
UFPB	Universidade Federal da Paraíba

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>17</b>
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>18</b>
3.1 Dermatofitose e dermatófitos .....	18
3.2 Tratamento farmacológico da dermatofitose .....	21
3.3 Resistência aos antifúngicos e fatores de virulência .....	22
3.3.1 Biofilmes .....	23
3.4 Riparina 3 .....	25
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>28</b>
4.1 Drogas-teste .....	28
4.2 Fungos .....	28
4.3 Atividade antifúngica .....	30
4.3.1 Concentração inibitória mínima (CIM) .....	30
4.3.2 Concentração fungicida mínima (CFM) .....	31
4.4 Estudos em biofilmes <i>in vitro</i> .....	32
4.4.1 Formação do biofilme .....	32
4.4.2 Efeitos sobre a formação do biofilme <i>in vitro</i> .....	34
4.5 Estudos em biofilmes <i>ex vivo</i> .....	36
4.6 Detecção de sulfito .....	38
4.7 Análise estatística .....	39
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>48</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>54</b>
<b>APÊNDICE A</b> .....	<b>60</b>
<b>APÊNDICE B</b> .....	<b>61</b>
<b>ANEXO A</b> .....	<b>65</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As dermatofitoses (*tineas*) são infecções fúngicas, com invasão e propagação dos dermatófitos em estruturas queratinizadas. As *tineas* estão entre as causas mais comuns de doenças de pele no mundo, e a prevalência real provavelmente está subestimada. Especificamente no Brasil, a *tinea unguium* (infecção nas unhas) é a dermatofitose mais frequente. *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* e *Nannizzia gypsea* tornaram-se as principais espécies (Pereira *et al.*, 2021). Embora a dermatofitose seja geralmente restrita à superfície do tecido cutâneo, os fungos podem ser invasivos e causar uma infecção profunda e disseminada em pacientes imunodeprimidos (Rouzaud; Lanternier; Puel, 2017).

Para contornar essa situação, as opções terapêuticas disponíveis para o tratamento das dermatofitoses compõe uma variedade de antifúngicos orais e/ou tópicos. Terbinafina e itraconazol oral correspondem ao tratamento de escolha e possuem tempos de tratamento mais curtos e melhores taxas de cura. Entretanto, esses antifúngicos apresentam riscos, como interações medicamentosas e toxicidade. (Kreijkamp-Kaspers *et al.*, 2017). Algumas opções de antifúngicos tópicos foram desenvolvidas nos últimos anos com diferentes posologias e variações nas formulações farmacêuticas. Ciclopirox (CPX) é uma das principais drogas tópicas eficazes, assim, optou-se por ele como antifúngico padrão neste estudo. O mecanismo antifúngico do CPX envolve a interrupção do metabolismo fúngico pela inibição de enzimas dependentes de ferro (Gupta; Foley; Versteeg, 2017; Costa *et al.*, 2022).

Mesmo com essas opções de tratamento, a resistência aos antifúngicos vem aumentando e causando falhas terapêuticas. Os dermatófitos produzem fatores de virulência, como adesinas fúngicas, enzimas líticas, bombas de sulfito e promovem adaptações metabólicas relevantes (Rodríguez; Vélez; Castro, 2012; Martinez-Rossi; Peres; Rossi, 2017), bem como produzem biofilmes, atualmente considerados um dos mais importantes fatores envolvidos em resistência às drogas convencionais (Brilhante *et al.*, 2017). Células fúngicas em biofilmes produzem uma matriz extracelular, que atua como barreira física, reduzindo a concentração efetiva de drogas para as células dentro do biofilme (Pereira, 2021).

Diante desse contexto, as pesquisas que buscam novos fármacos para o tratamento das dermatofitoses devem considerar a ação contra os biofilmes. Além disso, novos antifúngicos que atuem em fatores de virulência relevantes para a formação de biofilmes, como a liberação de sulfito, podem contribuir para o controle do estabelecimento e agravamento da infecção. As riparinas estão entre os fitoquímicos mais extensivamente estudados como compostos líderes para o desenvolvimento de novas drogas. Riparina 3 (RIP 3) é um alcaloide do tipo alcalamida estruturalmente relacionado com benzamida que foi inicialmente isolada dos frutos de *Aniba riparia* (Nees) Mez. Seu homólogo sintético Nor-Riparina 3 (NOR3) é quimicamente semelhante, porém com um menor raio atômico, devido a remoção de um átomo de carbono da molécula (Barbosa Filho *et al.*, 1987; Barbosa Filho; Silva; Bhattacharyya, 1990).

Há uma tendência em explorar todo o potencial biológico dos fitoquímicos. Nesse sentido, várias atividades farmacológicas foram descritas para RIP3, como potencial ansiolítico (Melo *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2020), antidepressivo (Vasconcelos *et al.*, 2015) e atividade antibacteriana (Catão *et al.*, 2005; Oliveira Júnior *et al.*, 2020). Embora a maioria deles direcione o sistema nervoso, é relevante encontrar novos alvos farmacológicos. No entanto, até onde se sabe, não há relato de estudos biológicos da RIP3 e NOR3 contra dermatófitos. Por esta razão, focamos na atividade antifúngica e potencial antibiofilme dessas drogas contra os dermatófitos clinicamente relevantes (*T. rubrum*, *M. canis* e *N. gypsea*). Além disso, a inibição da secreção de sulfito foi hipotetizada como um provável mecanismo de atividade antibiofilme.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial antifúngico e antibiofilme da riparina 3 e seu homólogo sintético Nor- contra cepas de *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* e *Nannizzia gypsea*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) das drogas-teste;
- Avaliar o efeito das drogas-teste contra biofilmes *in vitro* e *ex vivo* das cepas ensaiadas;
- Investigar a ação das drogas-teste na inibição da secreção de sulfito.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Dermatofitose e dermatófitos

As dermatofitoses compreendem infecções fúngicas, que acometem os tecidos queratinizados como unhas, couro cabeludo, extrato córneo da pele, dentre outros produtos da epiderme e derme. Tal afinidade às estruturas queratinizadas está relacionada com o fato dos seus agentes etiológicos, denominados dermatófitos, degradarem e utilizarem como fonte de energia a queratina, por meio de queratinases e outras enzimas (Gnat *et al.*, 2019).

Clinicamente, as dermatofitoses são classificadas utilizando a denominação latina “*tinea*” seguida do local da lesão (também em latim), por exemplo: *tinea unguium* (infecção na unha). As lesões originadas geralmente encontram-se em níveis superficiais e são arredondadas, eritematosas e pruriginosas (Figura 1). No entanto, em casos de pacientes com deficiência autossômica recessiva de CARD9, imunodeficiência do HIV ou mesmo pacientes imunocompetentes, os dermatófitos podem invadir tecidos mais profundos causando infecção grave e disseminada (Rouzaud; Lanternier; Puel, 2017).

Embora as dermatofitoses raramente estejam associadas à mortalidade, elas reduzem significativamente a qualidade de vida dos hospedeiros, pois além do desconforto físico e coceira; consequências psicossociais, como vergonha, diminuição da autoestima, ansiedade e até depressão, são comuns nos pacientes (Narang *et al.*, 2019). Ademais, as dermatofitoses predispõe infecções secundárias, uma vez que comprometem a primeira barreira imunológica do organismo, a barreira cutânea (Rouzaud; Lanternier; Puel, 2017).

**Figura 1** - Apresentações clínicas das dermatofitoses.



A- *Tinea capitis*; B- *Tinea cruris*; C, D e F- *Tinea corporis*; E- *Tinea faciei*; G e H- *Tinea unguium*

Fonte: Chanyachailert; Leeyaphan; Bunyaratavej, 2023

Além do local afetado e do estado imunológico do hospedeiro, sua ampla variedade de apresentações clínicas ainda depende da espécie de dermatófito envolvida. Esses fungos podem ser encontrados em vários habitats de acordo com a preferência da origem da queratina consumida, sendo classificados em antropofílicos (fonte humana), zoofílicos (fonte animal) e geofílicos (fonte no solo). Esse segundo e terceiro grupo, também são patógenos ocasionais de humanos (Gnat *et al.*, 2019; Chanyachailert; Leeyaphan; Bunyaratavej, 2023).

Os dermatófitos são fungos filamentosos, hialinos e septados (Chanyachailert; Leeyaphan; Bunyaratavej, 2023). Classicamente, foram reconhecidos e agrupados em apenas 3 gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. Todavia, a

recente análise filogenética multilocus esclareceu a taxonomia desses fungos, onde 7 clados principais foram identificados e incluídos como gêneros, dentre eles *Arthroderma*, *Lophophyton*, *Paraphyton* e *Nannizzia*. Paralelamente, algumas espécies foram realocadas, a exemplo do *Microsporium gypseum*, que atualmente é denominado *Nannizzia gypsea* (De Hoog *et al.*, 2017).

Diversos estudos epidemiológicos enfatizam as dermatofitoses como um problema de saúde pública, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, como o Brasil, onde persiste o clima quente e úmido, que é favorável para o crescimento e disseminação dos dermatófitos. Particularmente na população brasileira, um recente estudo epidemiológico estimou prevalência em 25% de dermatofitoses, sendo *Trichophyton rubrum*, *Microsporium canis* e *N. gypsea* as principais espécies e *tinea unguium* como apresentação clínica mais frequente (Pereira *et al.*, 2021).

*T. rubrum* é um dermatófito antropofílico reconhecido como o principal agente responsável por causar dermatofitose. Sua transmissão é exclusivamente inter-humana ou por fômites contaminados. Em relação a sua morfologia, microscopicamente apresentam uma grande quantidade de microconídios, regulares e piriformes, associados a poucos macroconídios na forma de clavias alongadas. Macroscopicamente, possuem aspecto aveludado e esbranquiçados, além de ter um tom avermelhado púrpura no reverso de sua colônia (Sidrim; Rocha, 2010).

*M. canis* é o dermatófito zoofílico mais frequentemente encontrado entre as infecções em humanos, sendo as crianças e adolescentes os principais infectados, provavelmente devido à uma maior interação com animais anteriormente adoecidos. Em razão da falta de adaptação do fungo ao humano, quando em contato, produzem uma inflamação mais intensa do que as espécies antropofílicas. Morfologicamente, a microscopia óptica revela abundantes macroconídios fusiformes e parede espessa, enquanto seus microconídios podem ser sésseis ou pedunculados. Macroscopicamente suas colônias apresenta-se algodinosas, pulverulentas ou ainda produzir pigmentos amarelo-limão no reverso (Sidrim; Rocha, 2010; Andrade Júnior *et al.*, 2020).

*N. gypsea* é um dermatófito geofílico de distribuição mundial, considerada a espécie mais comum do grupo geofílico entre as infecções em humanos, cuja transmissão ocorre através do contato com o solo ou a partir de animais infectados, causando quadros clínicos agudos com sintomas fortemente expressos de resposta

inflamatória semelhante às espécies zoofílicas. Frequentemente, as crianças são os hospedeiros-alvo. Em relação a sua morfologia, microscopicamente apresentam macroconídios alongados de parede delgada, enquanto que macroscopicamente dispõem de colônias pulverulentas (Sidrim, Rocha; 2010; Dolenc-Voljč; Gasparič, 2017).

### 3.2 Tratamento farmacológico da dermatofitose

Atualmente existe uma variedade considerável de opções terapêuticas ofertadas para o tratamento das dermatofitoses, seja de uso oral, seja de uso tópico, bem como associando-se essas 2 vias de administração (terapia combinada). Apesar disso, é comum que os pacientes negligenciem e abandonem o tratamento, pois geralmente é longo e está associado a efeitos adversos (Gnat; Lagowski; Nowakiewicz, 2020).

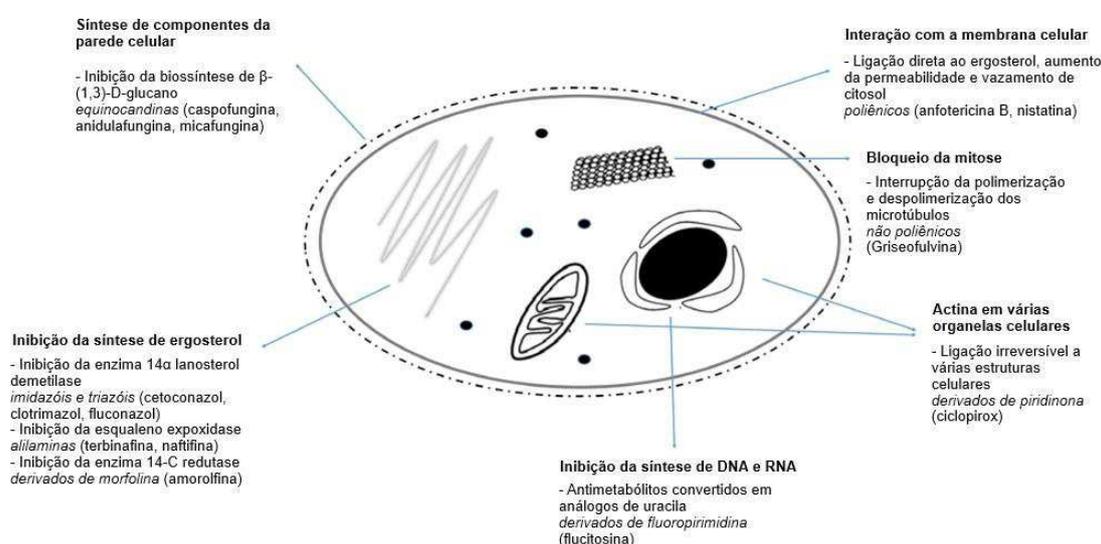
Alguns agentes antifúngicos sistêmicos se destacam na utilização clínica, entre os quais pode-se citar os azóis (itraconazol, fluconazol, cetoconazol) griseofulvina e terbinafina. Eles possuem tempos de tratamento mais curtos e melhores taxas de cura, mas apresentam riscos mais significativos, como complicações hepáticas e gastrointestinais, além de interações com outras drogas. Dessa forma, para a utilização desses medicamentos é importante um monitoramento mais próximo (Kreijkamp-Kaspers *et al.*, 2017).

No que diz respeito ao mecanismo de ação desses fármacos, os azóis e a terbinafina atuam na biossíntese do ergosterol, o componente majoritário e essencial das membranas celulares dos fungos. Para isso, a terbinafina inibe a enzima esqualeno epoxidase, enquanto os azóis inibem a enzima esterol 14  $\alpha$ -desmetilase, ambos levando à depleção do ergosterol e acúmulo de esteróis 14-metilados e esqualeno, afetando assim a organização da membrana e resultando em morte fúngica. A griseofulvina, por sua vez, possui ação no processo de divisão celular, interferindo na formação de microtúbulos, prejudicando o fuso mitótico e o crescimento fúngico, como pode ser observado na figura 2 (Gnat; Lagowski; Nowakiewicz, 2020).

Algumas opções de antifúngicos tópicos foram desenvolvidas nos últimos anos com diferentes posologias e variações nas formulações farmacêuticas (Costa *et al.*, 2022). A terapia tópica é comumente recomendada devido à sua eficácia e segurança, bem como ao menor risco em comparação aos medicamentos sistêmicos. Efinaconazol, tavaborol e ciclopirox (CPX) são as principais drogas tópicas eficazes.

O mecanismo antifúngico do CPX envolve a interrupção do metabolismo fúngico, inibindo enzimas dependentes de ferro e aumentando a permeabilidade da membrana. Além disso, pesquisas recentes sobre seu mecanismo de ação mostraram que o CPX aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio e peroxinitrito, resultando em peroxidação lipídica e subsequente diminuição do teor de ergosterol. Coletivamente, esses mecanismos provocam uma redução na viabilidade fúngica, como pode ser observado na figura 2 (Gupta; Foley; Versteeg, 2017; Carmo *et al.*, 2022).

**Figura 2 - Antifúngicos atualmente utilizados no tratamento das dermatofitoses e seus alvos celulares.**



Fonte: Gnat; Lagowski; Nowakiewicz, 2020

### 3.3 Resistência aos antifúngicos e fatores de virulência

A resistência na prática clínica, definida como persistência da infecção ou sintomas mesmo com a utilização de antifúngicos, vem aumentando e causando falhas na eliminação dos patógenos. Em geral, os mecanismos desenvolvidos por esses micro-organismos, baseiam-se em três principais processos: (1) redução do acúmulo do fármaco dentro da célula fúngica, (2) alterações no alvo das drogas, e (3) indução de vias celulares de resposta ao estresse (Lee; Robbins; Cowen, 2023).

Particularmente, os dermatófitos provocam a superexpressão de bombas de efluxo nas membranas celulares, como os transportadores ABC, que promovem a expulsão e redução do acúmulo do fármaco no meio intracelular. Também, se tem

bem elucidado na literatura a ocorrência de mutações no gene que codifica a esqualeno epoxidase, o alvo molecular da terbinafina, acarretando em mudanças estruturais nessa enzima, assim diminuindo a afinidade da droga pelo seu alvo. Além disso, os dermatófitos promovem adaptações ao estresse por meio da secreção de proteínas, estabilizando a célula fúngica na presença do medicamento (Khurana; Sardana; Chowdhary, 2019).

Diante desse cenário de resistência, é crucial compreender afundo a patogênese fúngica para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e drogas antifúngicas. Uma série de fatores de virulência têm sido descritos na patogênese da dermatofitose. Os fatores de virulência são as habilidades com que os dermatófitos chegam a causar invasão, infecção, modulação da resposta imune a seu favor e dificuldade em tratá-los. De modo geral, esses fatores incluem adesão, invasão e crescimento (Rodríguez; Vélez; Castro, 2012; Martinez-Rossi; Peres; Rossi, 2017).

Primeiramente, ocorre a adesão por meio de moléculas de superfície expressas na parede celular fúngica, as adesinas, que permitem uma rápida fixação ao tecido do hospedeiro, impedindo a eliminação do patógeno pelos mecanismos de defesa do hospedeiro; então a germinação ocorre duas a três horas após a adesão. Isso é seguido pela penetração das hifas para evitar que elas sejam eliminadas com o epitélio. Uma vez instalados, os dermatófitos promovem alterações metabólicas para utilização de nutrientes do tecido hospedeiro por meio de enzimas como permeases e enzimas da parede celular, bem como outras enzimas líticas como nucleases, lipases, proteases não específicas e queratinases (Rodríguez; Vélez; Castro, 2012; Martinez-Rossi; Peres; Rossi, 2017).

Além disso, os dermatófitos possuem uma bomba de sulfito, um importante fator de virulência responsável pela sulfitólise, processo pelo qual as pontes dissulfeto da queratina são dissociadas, facilitando a digestão por outras endo e exopeptidases, a exemplo das queratinases. As pontes dissulfeto são responsáveis por tornar a queratina dura e difícil de quebrar; o sulfito secretado pelos dermatófitos reduz essas pontes e as dissocia diretamente (Rodríguez; Vélez; Castro, 2012).

### **3.3.1 Biofilmes**

Recentemente, tem sido observado um aspecto notável das dermatofitoses relacionado à capacidade dos seus agentes etiológicos em desenvolver biofilmes.

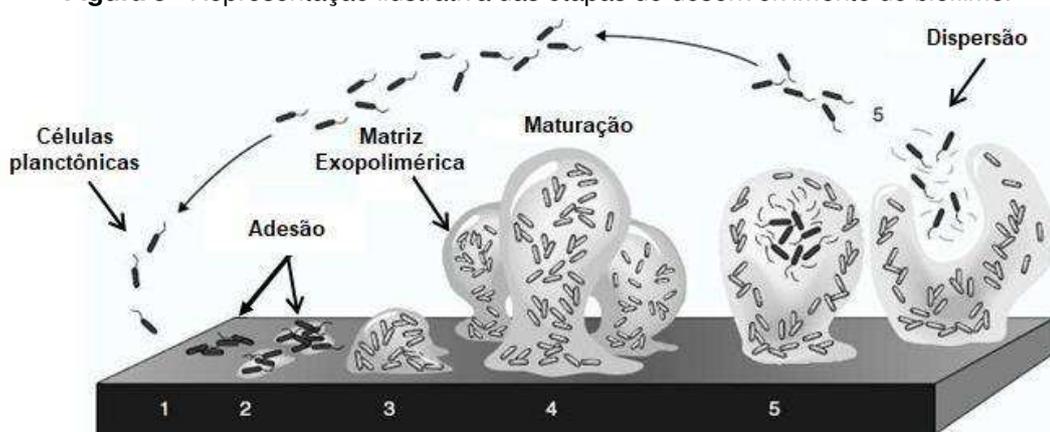
Burkhart *et al.* no ano de 2002, introduziram a ideia dos biofilmes dermatofíticos, descrevendo um dermatofitoma. Desde então, diversos estudos surgiram com o interesse de estudar e entender melhor a capacidade dos dermatófitos de formar biofilmes, tanto em modelos *in vitro* como em *ex vivo* (Brilhante *et al.*, 2017; Pereira, 2021).

Os biofilmes são definidos como uma comunidade de células envolvidas em uma matriz exopolimérica autoproduzida, dessa forma sendo uma estrutura mais complexa e organizada quando comparada às células planctônicas. A matriz extracelular é geralmente constituída de substâncias poliméricas, como polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, que se acumulam conforme o biofilme amadurece (Markantonatou; Samaras; Vyzantiadis, 2023; Pereira, 2021).

Essa estrutura contribui para proteção contra fatores externos, escape do sistema imune e cooperação entre as células, além do fenótipo de tolerância aumentada aos antifúngicos, em comparação às formas planctônicas. De fato, as concentrações efetivas inibindo ou erradicando os biofilmes de dermatófitos normalmente são maiores do que as concentrações inibitórias mínimas encontradas em ensaios nas condições planctônicas para as mesmas cepas fúngicas (Pereira, 2021).

A formação e o desenvolvimento do biofilme fúngico é um processo de múltiplos estágios que começa com a adesão microbiana a um substrato adequado, que pode ser uma superfície mucosa ou abiótica. Em seguida, ocorre a proliferação de células fúngicas sobre tal superfície e indução da formação de estruturas hifais, com subsequente produção de uma matriz extracelular, que finaliza com a disseminação das células microbianas (Figura 2) (Oliveira; Cardoso, 2018; Markantonatou; Samaras; Vyzantiadis, 2023).

**Figura 3** - Representação ilustrativa das etapas de desenvolvimento do biofilme.



Fonte: Oliveira; Cardoso, 2018.

Atualmente a capacidade de 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, resistência e maior tolerância às drogas convencionais (Brilhante *et al.*, 2017). Diante desse cenário, tem-se estimulado pesquisas na expectativa de encontrar novos produtos alternativos para contornar os problemas supracitados.

### 3.4 Riparina 3

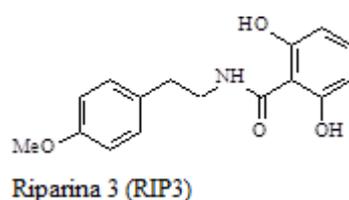
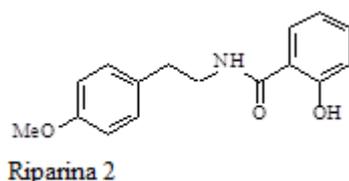
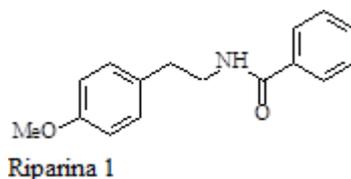
As plantas são consideradas fontes promissoras de substâncias de interesse farmacológico, pois têm a capacidade de sintetizar uma ampla gama de compostos bioativos a partir do seu metabolismo secundário. Essa sinergia entre ciência e natureza, tem impulsionado as pesquisas farmacológicas em produtos naturais que exibem diversas atividades biológicas de interesse médico (Noor *et al.*, 2022).

Nesse contexto, insere-se a espécie *Aniba riparia* (Nees) Mez, uma árvore da família Lauraceae, típica da região amazônica, identificada pela primeira vez por Mez em 1889. Do ponto de vista fitoquímico, seus frutos verdes contêm vários constituintes pertencentes à classe dos lignoides, terpenoides, assim como benzoatos de benzila, benzaldeídos e pironas (Barbosa Filho *et al.*, 1987).

Além dessas substâncias, do fruto verde de *Aniba riparia* (Nees) Mez, foram isoladas algumas alcaloides, uma classe especial de alcaloides, estruturalmente relacionado com benzamidas, nomeadas de riparinas 1, 2 e 3 (Figura 3), denominação esta em homenagem à planta. Comumente, Riparina 3 (RIP3) é o principal composto

obtido de *Aniba riparia*, representando 34% do extrato natural (Barbosa Filho *et al.*, 1987; Barbosa Filho; Silva; Bhattacharyya, 1990).

**Figura 4** - Estruturas químicas das Riparinas 1, 2 e 3.

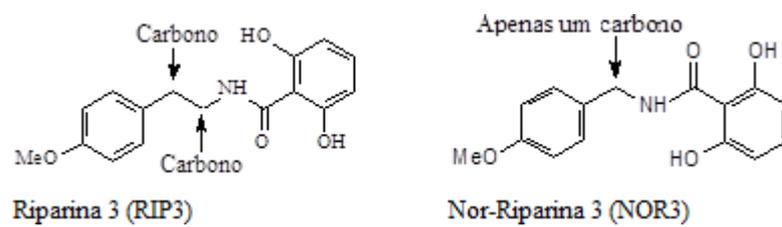


Fonte: Silva E. *et al.*, 2023.

Este conjunto de substâncias, juntamente aos seus homólogos e análogos sintéticos, têm apresentado um amplo espectro de atividades farmacológicas. Especificamente RIP3 apresenta evidências na literatura quanto a efeitos ansiolíticos (Melo *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2020), antidepressivos e aumento do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Vasconcelos *et al.*, 2015), bem como demonstrou ação antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Acinetobacter baumannii* (Oliveira Júnior *et al.*, 2020).

Tendo em vista o grande potencial da RIP3, é de extrema relevância explorar novos alvos farmacológicos, assim como viabilizar remodelações deste composto, de maneira a obter moléculas que supram a demanda crescente por substâncias estruturalmente inovadoras para possibilitar novos estudos farmacológicos. Neste contexto, insere-se a Nor-Riparina 3 (NOR3), que basicamente possui a mesma estrutura química da RIP3, porém com uma contração/diminuição do seu raio atômico, devido a remoção de um átomo de carbono da cadeia alquílica da porção tiramina (Figura 4).

**Figura 5** - Comparação das estruturas químicas da Riparina 3 e seu homólogo sintético Nor-.



Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

## 4 METODOLOGIA

Esta pesquisa foi conduzida no Laboratório de Bioquímica, situado no Centro de Educação e Saúde (CES) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). Além disso, obteve-se o suporte e colaboração do Laboratório de Microbiologia, que faz parte do mesmo centro. Cabe destacar que o presente estudo foi devidamente registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, sob o código AECBD36 (Apêndice A).

### 4.1 Drogas-teste

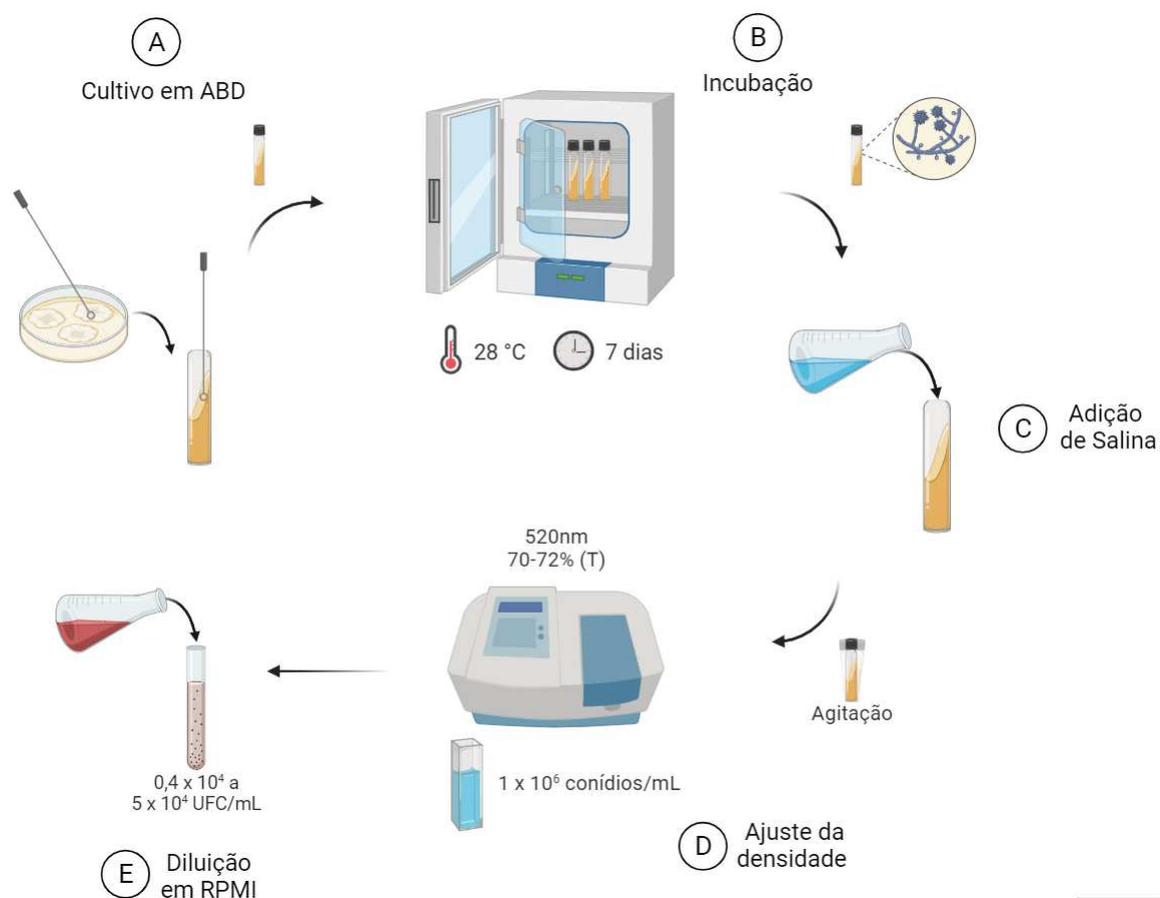
A riparina 3 e seu homólogo sintético Nor-, foram gentilmente fornecidos pelo Grupo de Produtos Naturais e Sintéticos da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Por sua vez, o ciclopirox, um antifúngico convencional, utilizado na presente pesquisa como controle positivo, foi adquirido da Sigma-Aldrich®. Para a preparação das drogas-teste, dissolvemos inicialmente essas substâncias em dimetilsulfóxido (DMSO) e as diluímos em meio RPMI 1640, também da Sigma-Aldrich®, para alcançar uma concentração inicial de 1024 µg/mL. Vale ressaltar que a concentração máxima de DMSO utilizada não excedeu 0,5%. A partir dessa concentração inicial, foram realizadas diluições seriadas adicionando meio RPMI 1640, a fim de alcançar concentrações inferiores.

### 4.2 Fungos

Foram utilizadas diversas linhagens fúngicas de dermatófitos em nossos ensaios de atividade antifúngica (Tabela 1). Estas linhagens incluíram: *Trichophyton rubrum* ATCC 28188; *T. rubrum* LM 03 (isolada de couro cabeludo); *T. rubrum* LM 06 (isolada de unhas); *T. rubrum* LM 63 (isolada de unhas); *T. rubrum* LM 70 (isolada de couro cabeludo); *T. rubrum* LM 176 (isolada de tórax); *Microsporum canis* ATCC 36295; *M. canis* LM 177 (isolada de couro cabeludo); *M. canis* LM 186 (isolada de braço); *M. canis* LM 216 (isolada de couro cabeludo); *M. canis* LM 232 (isolada de pés); *M. canis* LM 665 (isolada de 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) e *N. gypsea* LM 305

(isolada de pés). Todas essas cepas fúngicas foram obtidas a partir da coleção do Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPB. Para preparar as cepas para os ensaios, cultivou-se cada uma delas em Ágar Batata Dextrose (ABD) da marca Difco®, mantendo a incubação a 28°C por até 7 dias. As colônias fúngicas recém-cultivadas foram cobertas com solução salina estéril (NaCl 0,9%) e agitadas de maneira suave. Em seguida, ajustou-se a densidade das suspensões de cada cepa por meio de um espectrofotômetro, estabelecendo uma transmitância de 70-72% a 520 nm. Isso correspondia a um inóculo com uma concentração aproximada de  $1 \times 10^6$  UFC/mL, de acordo com Santos, Barros e Hamdan (2006). Posteriormente, diluímos cada inóculo em meio RPMI 1640 para atingir uma concentração final que variou entre  $0,4 \times 10^4$  a  $5 \times 10^4$  UFC/mL (CLSI, 2017).

**Figura 6** - Esquema ilustrativo do procedimento de preparação do inóculo fúngico.



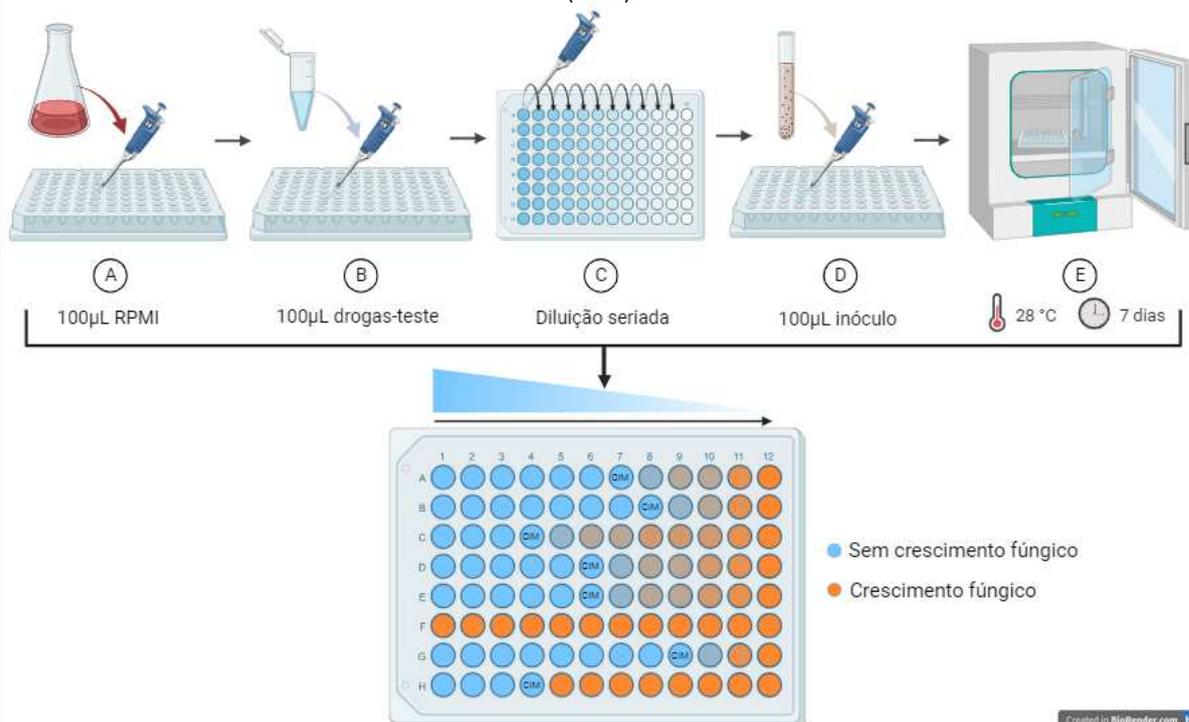
Fonte: Pesquisador, 2023.

### 4.3 Atividade antifúngica

#### 4.3.1 Concentração inibitória mínima (CIM)

Para determinar a CIM das drogas-teste, empregou-se a técnica de microdiluição, conforme descrito pelas diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017). Em cada linha da placa, adicionou-se 100  $\mu$ L das drogas-teste, que foram duplamente concentradas e diluídas em meio RPMI 1640, com concentrações variando de 1024 a 16 mg/L. Em seguida, em cada cavidade da placa adicionou-se 100  $\mu$ L do inóculo que havia sido preparado antecipadamente. Foi realizado dois controles adicionais: um controle negativo contendo apenas RPMI 1640 e inóculo, e um controle com DMSO composto por DMSO, inóculo e RPMI 1640. As placas foram devidamente seladas e incubadas a uma temperatura de 28°C por um período máximo de 7 dias, com o objetivo de realizar a leitura das CIMs. A CIM foi definida como a menor concentração das drogas que, quando comparada às cavidades dos controles, inibiu visualmente o crescimento fúngico.

**Figura 7** - Esquema ilustrativo do procedimento da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

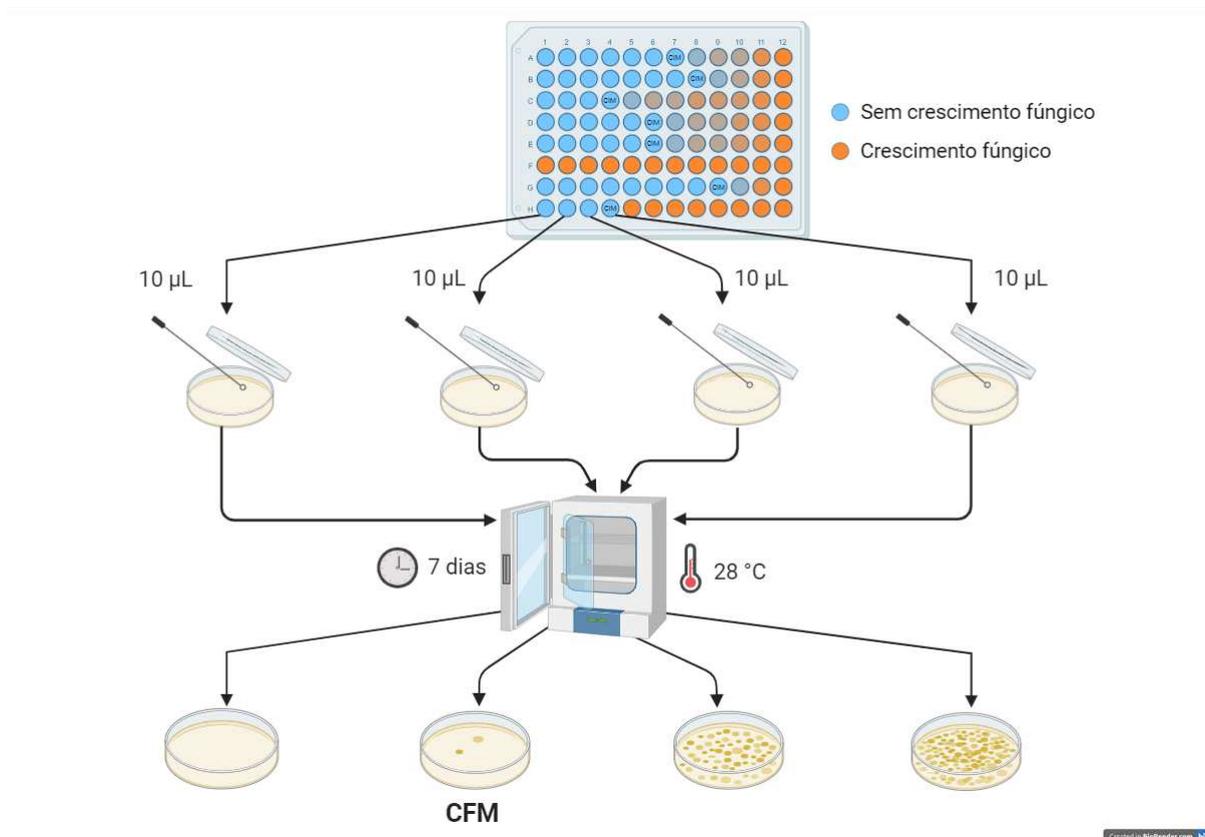


Fonte: Pesquisador, 2023.

### 4.3.2 Concentração fungicida mínima (CFM)

Realizou-se a coleta de alíquotas de 10  $\mu$ L de cada poço contendo concentrações superiores ou iguais à CIM, que foram subsequentemente semeadas em placas contendo Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) da marca Difco®. Para determinar a viabilidade dos fungos, procedemos à contagem das colônias após a incubação das placas a uma temperatura de 28°C por um período de até 7 dias. A CFM foi definida como a menor concentração de droga na qual o crescimento fúngico resultou em menos de três colônias, o que representa uma taxa de mortalidade de 99,9%, conforme definido por Quadros *et al.* (2011). A ação da droga foi classificada como fungicida quando a relação entre a CFM e a CIM não excedeu o valor de 4. Em contraste, foi considerada fungistática quando a relação CFM/CIM foi superior a 4, de acordo com a definição de Hazen (1998). As melhores drogas-teste, aquelas que demonstraram os resultados mais promissores, foram selecionadas para serem utilizadas nos ensaios subsequentes.

**Figura 8** - Esquema ilustrativo do procedimento da determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM).



Fonte: Pesquisador, 2023.

## 4.4 Estudos em biofilmes *in vitro*

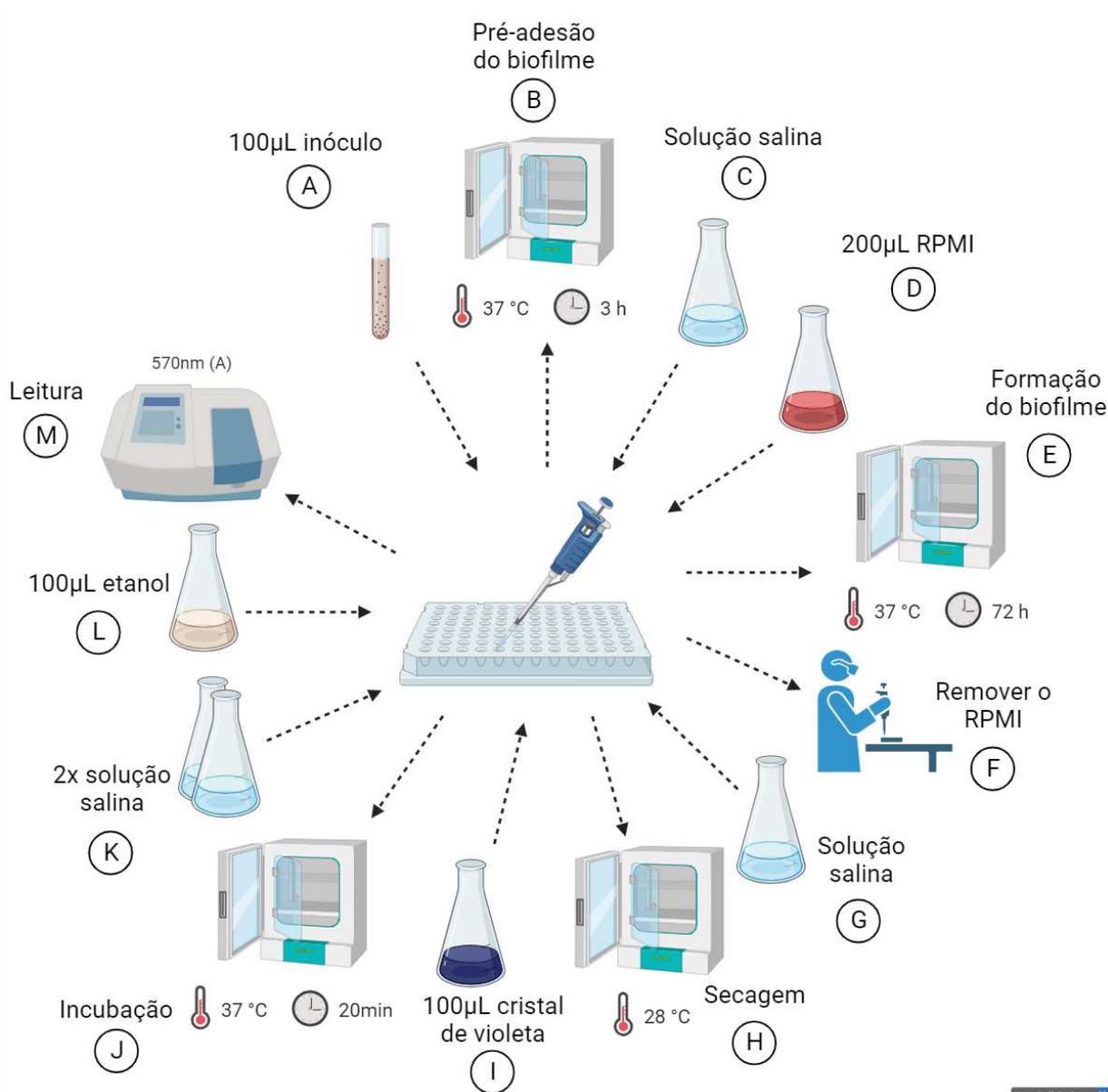
### 4.4.1 Formação do biofilme

O ensaio de formação de biofilme foi conduzido em placas de poliestireno de 96 poços, seguindo o procedimento descrito por Brilhante *et al.* (2018). Inicialmente, adicionou-se 100 µL de uma suspensão de inóculo fúngico ( $1 \times 10^6$  UFC/mL) em cada poço da placa, seguido de incubação a 37°C por um período de 3 horas para permitir a pré-adesão do biofilme. Após esse período, procedeu-se à lavagem dos poços com solução salina estéril para remover as células não aderentes. Em seguida, foi acrescentado alíquotas de 200 µL de meio RPMI 1640 aos poços e as placas foram incubadas a 37°C, sem agitação, ao longo de 72 horas para promover a formação do biofilme.

Após o período de incubação, o meio de cultura de cada poço foi removido e realizou-se uma lavagem com solução salina estéril. Posteriormente, as placas foram submetidas à secagem. Para avaliar a quantidade de biofilme formado, adicionou-se 100 µL de uma solução de cristal de violeta (0,5% em etanol) a cada poço e incubamos por 20 minutos. Após essa etapa, procedeu-se a duas lavagens com solução salina estéril e, em seguida, os biofilmes foram descoloridos adicionando 100 µL de etanol a 95%. Finalmente, a absorvância da solução em cada poço foi medida a um comprimento de onda de 570 nm, conforme descrito por Costa-Orlandi *et al.* (2014) (Figura 9).

Com base nos resultados obtidos, classificou-se cada cepa de acordo com seu grau de produção de biofilme. O valor de corte da densidade óptica (DO) para o teste foi estabelecido em relação aos valores do controle negativo, que consistia apenas de meio RPMI 1640, sem biofilme. O valor de corte (DOc) foi definido como três desvios padrão acima da média da DO a 570 nm do controle negativo. De acordo com essa definição, as cepas foram categorizadas como não produtoras ( $DO \leq DOc$ ), produtoras fracas ( $DOc < DO \leq 2 \times DOc$ ), produtoras moderadas ( $2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$ ) e produtoras fortes de biofilme ( $DO > 4 \times DOc$ ) (Cordeiro *et al.* 2015). Nas etapas subsequentes do experimento, utilizou-se as cepas *T. rubrum* ATCC 28188, *M. canis* ATCC 36295 e *N. gypsea* ATCC 24102, uma vez que demonstraram sensibilidade às drogas testadas e produção de biofilme forte ou moderada.

**Figura 9** - Esquema ilustrativo do procedimento para a formação do biofilme *in vitro*.



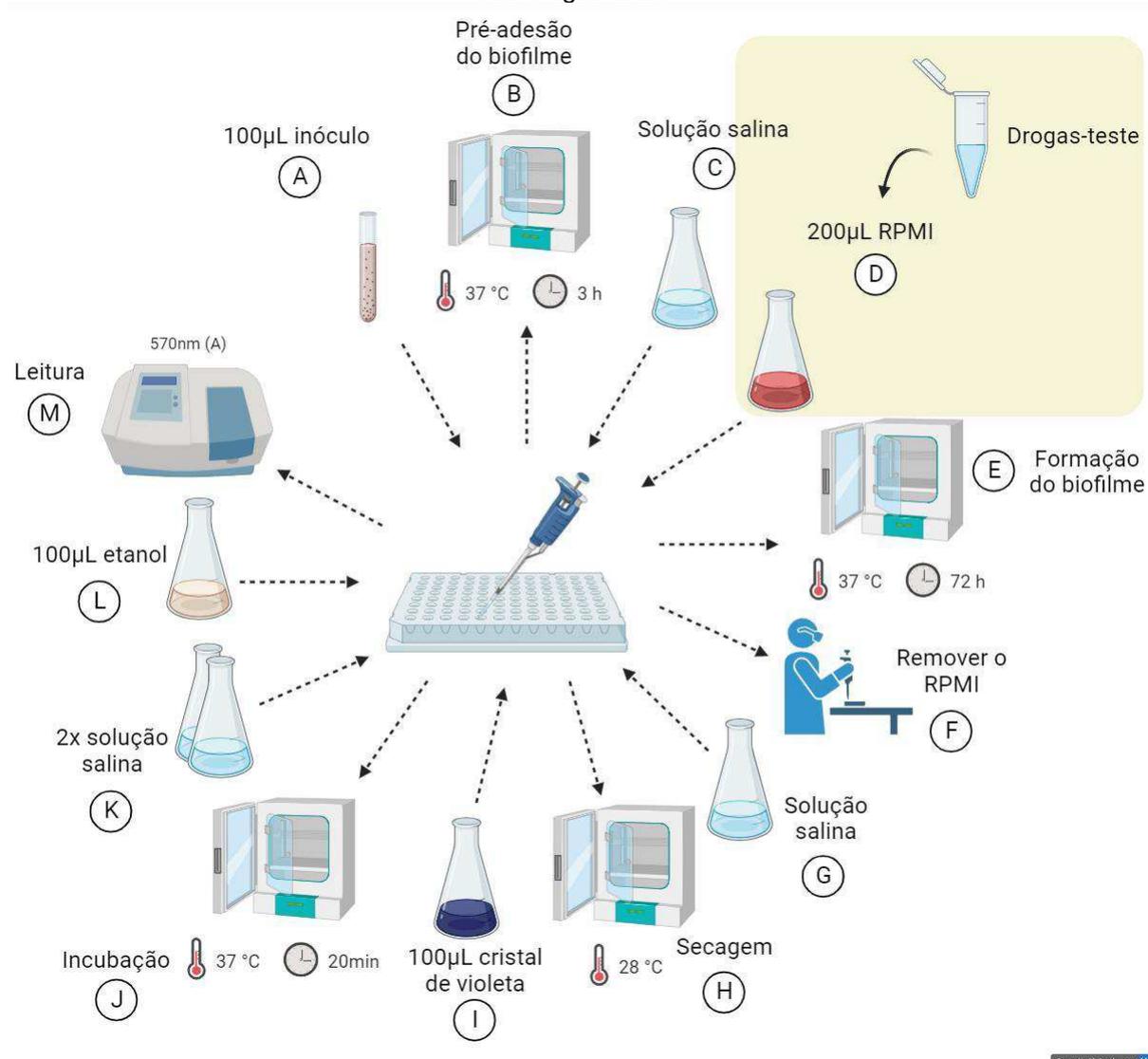
Fonte: Pesquisador, 2023.

#### 4.4.2 Efeitos sobre a formação do biofilme *in vitro*

O mesmo experimento anterior foi realizado, contudo, desta vez, na presença das drogas-teste. Após o período de pré-adesão, adicionou-se 200 µL de meio RPMI 1640 contendo as concentrações das drogas-teste (CIM, 2xCIM, 4xCIM e 8xCIM), nos poços correspondentes. Foi utilizado um controle negativo contendo meio RPMI 1640 livre de formação de biofilme. As placas foram então incubadas a 37°C, sem agitação, por um período de 72 horas. Para quantificar a biomassa do biofilme formado na

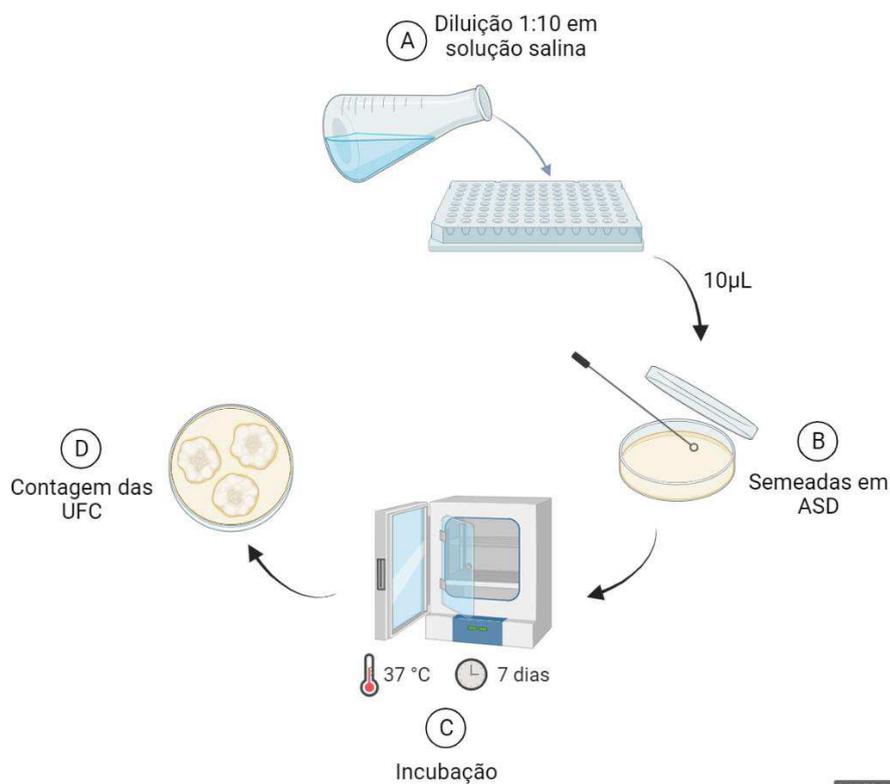
presença e ausência das drogas, empregou-se o método do cristal violeta a 0,5%, conforme descrito por Ali *et al.* (2016) (Figura 10). A viabilidade do biofilme foi avaliada por meio da contagem de UFC, seguindo o protocolo de Chen *et al.* (2019). Após o período de formação do biofilme de 72 horas, adicionamos 100  $\mu$ L de solução salina estéril a cada poço e realizamos uma agitação vigorosa para assegurar a completa suspensão das células do biofilme. Posteriormente, diluímos as suspensões em uma proporção de 1:10 em solução salina estéril e semeamos 10  $\mu$ L das diluições resultantes na superfície de placas contendo meio de ASD. As placas foram então incubadas a 28°C por um período de 7 dias para permitir a contagem das UFC (Figura 12).

**Figura 10** - Esquema ilustrativo do procedimento para a quantificação do biofilme *in vitro* na presença das drogas-teste.



Fonte: Pesquisador, 2023.

**Figura 11** - Esquema ilustrativo do procedimento para avaliar a viabilidade do biofilme *in vitro*.



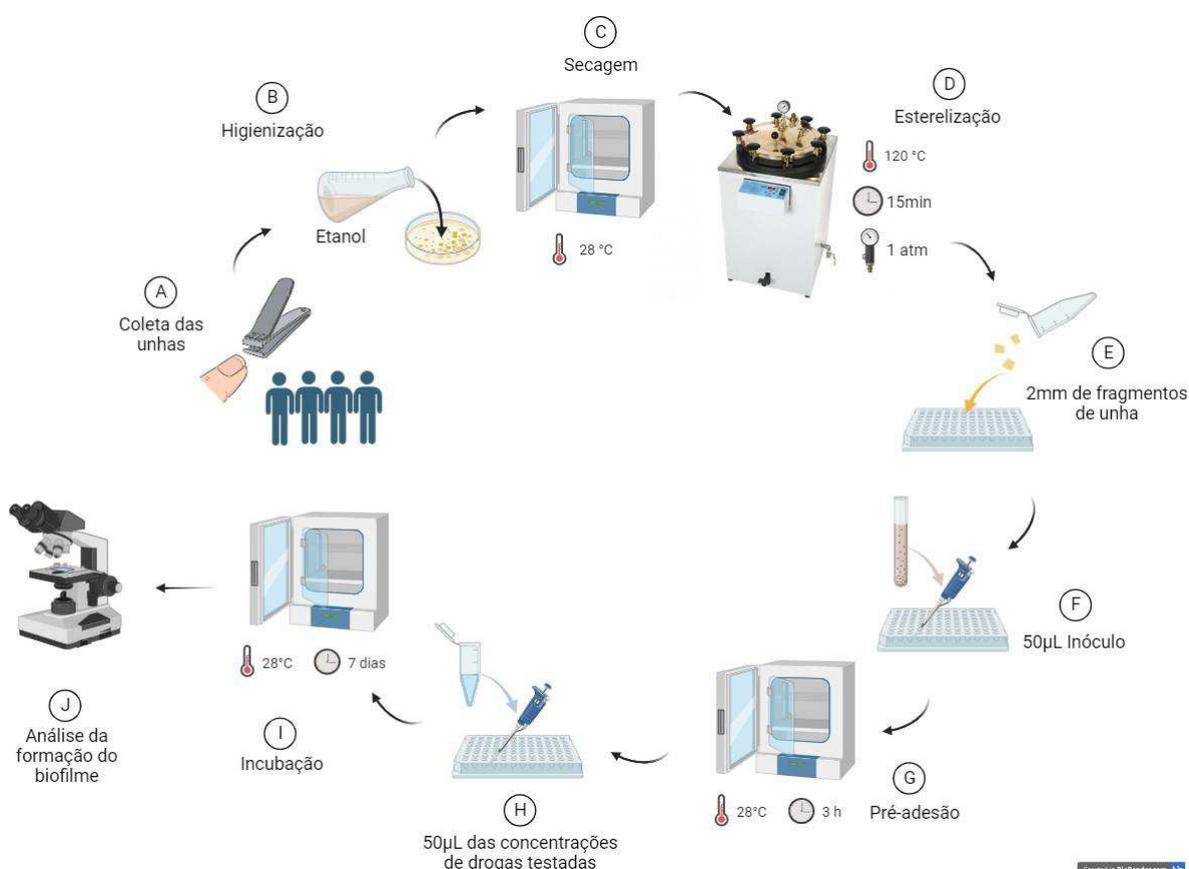
Fonte: Pesquisador, 2023.

#### 4.5 Estudos em biofilmes *ex vivo*

Amostras de fragmentos de unhas foram coletadas de quatro adultos do sexo masculino com idade superior a 18 anos. A obtenção do material biológico seguiu os procedimentos estabelecidos pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, conforme registrado sob o protocolo número 0157/11 (Apêndice B). Para preparar as amostras, os fragmentos de unha foram inicialmente desinfetados por imersão em etanol por 15 minutos, seguidos de secagem a 28°C e esterilização em autoclave a 120°C por 15 min a uma pressão de 1 atm. Após a esterilização, o material foi mantido em tubos hermeticamente fechados até sua utilização nos experimentos. Os fragmentos de unha esterilizados, com cerca de 2 mm de comprimento, foram alocados em poços de placas de 96 poços e posteriormente inoculados com 50 µL da suspensão fúngica a 28°C por três horas. Subsequentemente, foram adicionados 50 µL das concentrações de drogas testadas (CIM, 2xCIM, 4xCIM e 8xCIM). Dois grupos

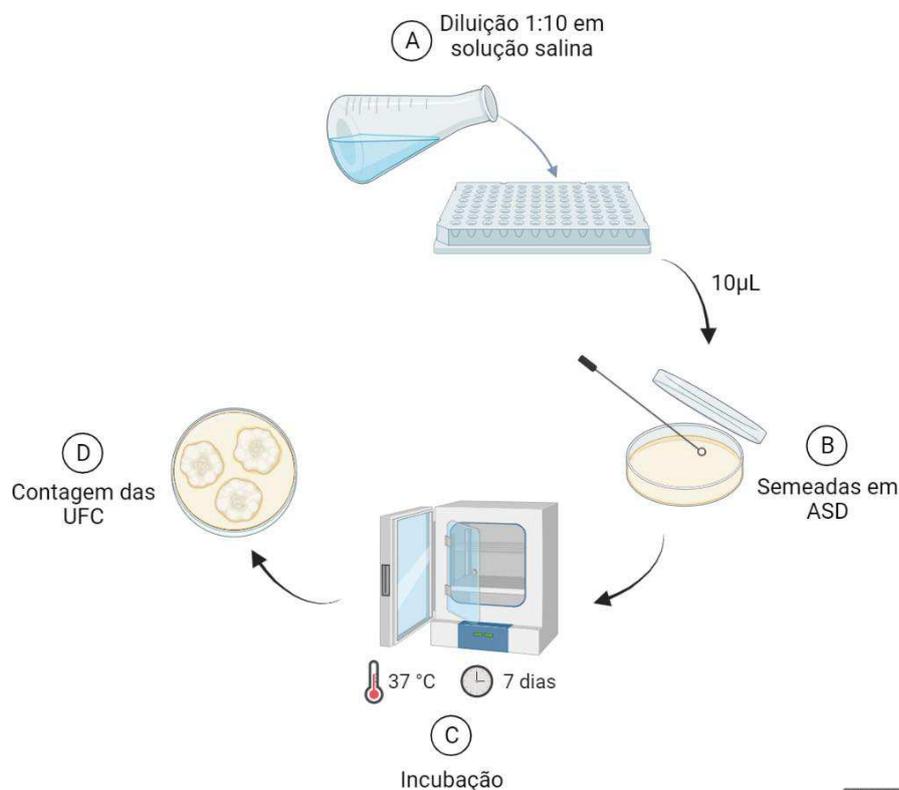
de controle foram estabelecidos: um sem a adição de drogas e outro sem a inoculação de fungos e drogas. As placas foram incubadas por um período de sete dias a 28°C. A análise do biofilme foi realizada por meio de microscopia óptica, permitindo a observação das estruturas de biofilme presentes nos fragmentos de unha. Para cada lâmina, examinou-se 10 campos de microscopia e foi registrado a intensidade das estruturas como "fortes (+++)", "intermediárias (++)", "baixas (+)", ou "ausentes (-)", conforme descrito por Abdel Aziz *et al.* (2020). Além disso, foi realizada a contagem das UFC dos biofilmes *ex vivo*. As suspensões foram diluídas em uma proporção de 1:10 em solução salina estéril, e 10 µL dessas diluições foram semeados na superfície de placas contendo meio de ASD. As placas foram então incubadas a 28°C por sete dias para permitir a contagem das UFC, conforme descrito por Chen *et al.* (2019). Cabe ressaltar que não foram observadas variações significativas nas taxas de crescimento dos biofilmes entre as unhas obtidas de diferentes indivíduos.

**Figura 12** - Esquema ilustrativo do procedimento para análise do biofilme *ex vivo*.



Fonte: Pesquisador, 2023.

**Figura 13** - Esquema ilustrativo do procedimento para avaliar a viabilidade do biofilme *ex vivo*.

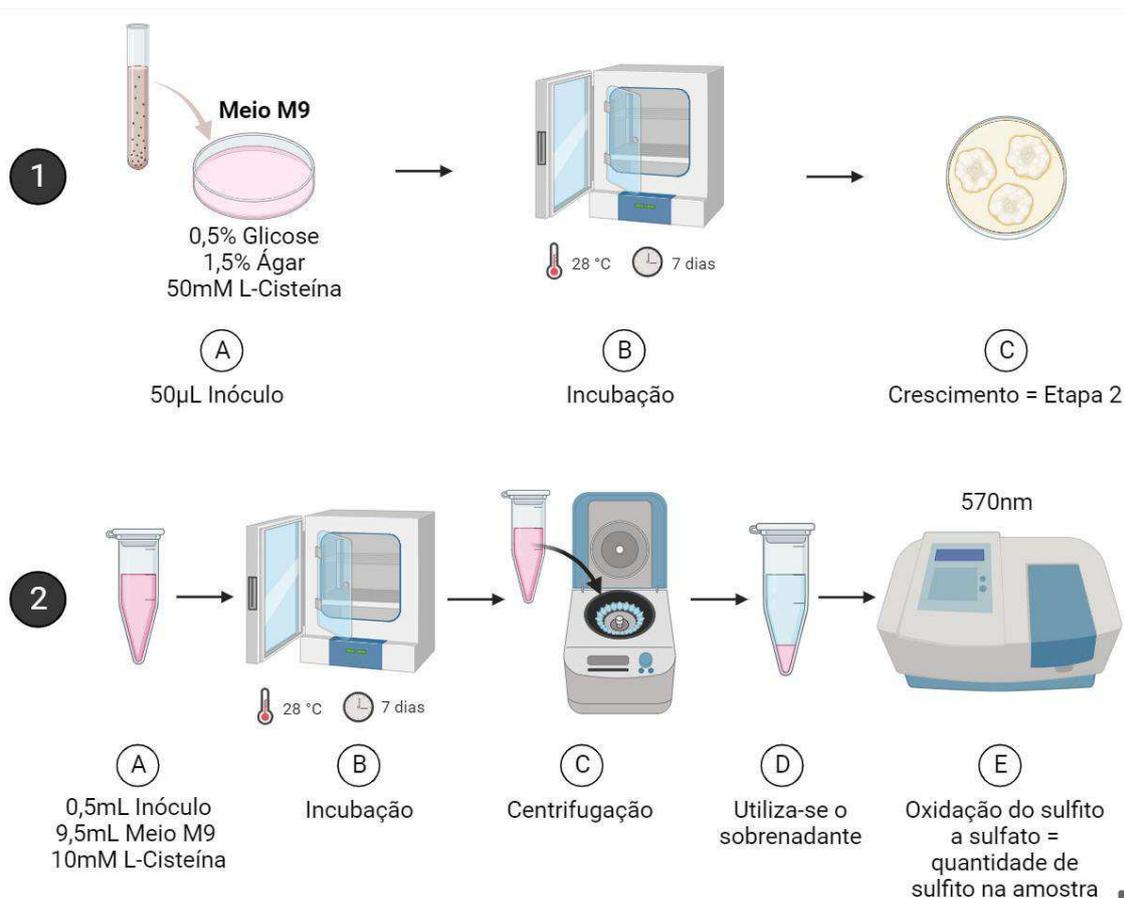


Fonte: Pesquisador, 2023.

#### 4.6 Detecção de sulfito

Inicialmente, foi realizado um ensaio para verificar a sensibilidade dos dermatófitos à cisteína. Uma alíquota de 50 µL do inóculo foi colocada na superfície de placas com meio M9 (Sigma-Aldrich®) suplementado com 0,5% de glicose, 1,5% de ágar e 50 mM de L-cisteína. As placas foram incubadas por 7 dias a 28°C para verificar a presença ou ausência de crescimento nessas condições. A próxima etapa de detecção de sulfito foi realizada com as cepas que cresceram em M9 com L-cisteína. Para isso, tubos contendo 0,5 mL do inóculo fúngico foram incubados com 9,5 mL de meio M9 (caldo) suplementado com 10 mM de L-cisteína. O material foi incubado por sete dias a 28°C e centrifugado a 1000g por 3 minutos. De acordo com as instruções do fabricante, o sobrenadante foi utilizado para o kit de detecção de sulfito (Sigma-Aldrich®). Este ensaio é baseado na oxidação do sulfito a sulfato produzindo um sinal estável em 570 nm, que é diretamente proporcional à quantidade de sulfito na amostra. (Grumbt *et al.*, 2013).

**Figura 14** - Esquema ilustrativo do procedimento para detecção de sulfito.



Fonte: Pesquisador, 2023.

#### 4.7 Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em triplicata. Os valores de CIM e CFM foram apresentados como moda, enquanto os resultados dos testes relacionados aos biofilmes foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP). Foi utilizado uma análise de variância (ANOVA) para identificar possíveis diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes tratamentos. Quando essas diferenças se mostraram estatisticamente relevantes, procedeu-se com o teste de Tukey. Utilizou-se o intervalo de confiança de 95%. Todas as análises estatísticas foram conduzidas utilizando o software R na versão 4.1.0, com a interface RStudio.

## 5 RESULTADOS

Os valores de CIM e CFM de RIP3, NOR3 e CPX estão registrados na tabela 1. NOR3 não apresentou atividade antifúngica contra as cepas testadas (CIM > 1024 mg/L). Por outro lado, RIP3 inibiu o crescimento de *T. rubrum* e *M. canis* a partir de 128 mg/L e *N. gypsea* a 256 mg/L, apresentando ação fungicida contra 89% das cepas testadas. O CPX inibiu todas as cepas em 2 mg/L, apresentando ação fungicida contra 94% das cepas testadas. Escolheu-se as cepas *T. rubrum* ATCC 28188, *M. canis* ATCC 36295 e *N. gypsea* ATCC 24102 para os ensaios posteriores para avaliar os efeitos da RIP3 em modelos *in vitro* e *ex vivo* de biofilme. Essas cepas foram sensíveis a RIP3 e produtoras de biofilme fortes/moderados em modelos de biofilme *in vitro* (Tabela 1).

**Tabela 1** - Valores de CIM, CFM (mg/L) e razão CFM/CIM da riparina 3, seu homólogo nor- e ciclopirox contra cepas de dermatófitos e a classificação da produção de biofilme de cada cepa.

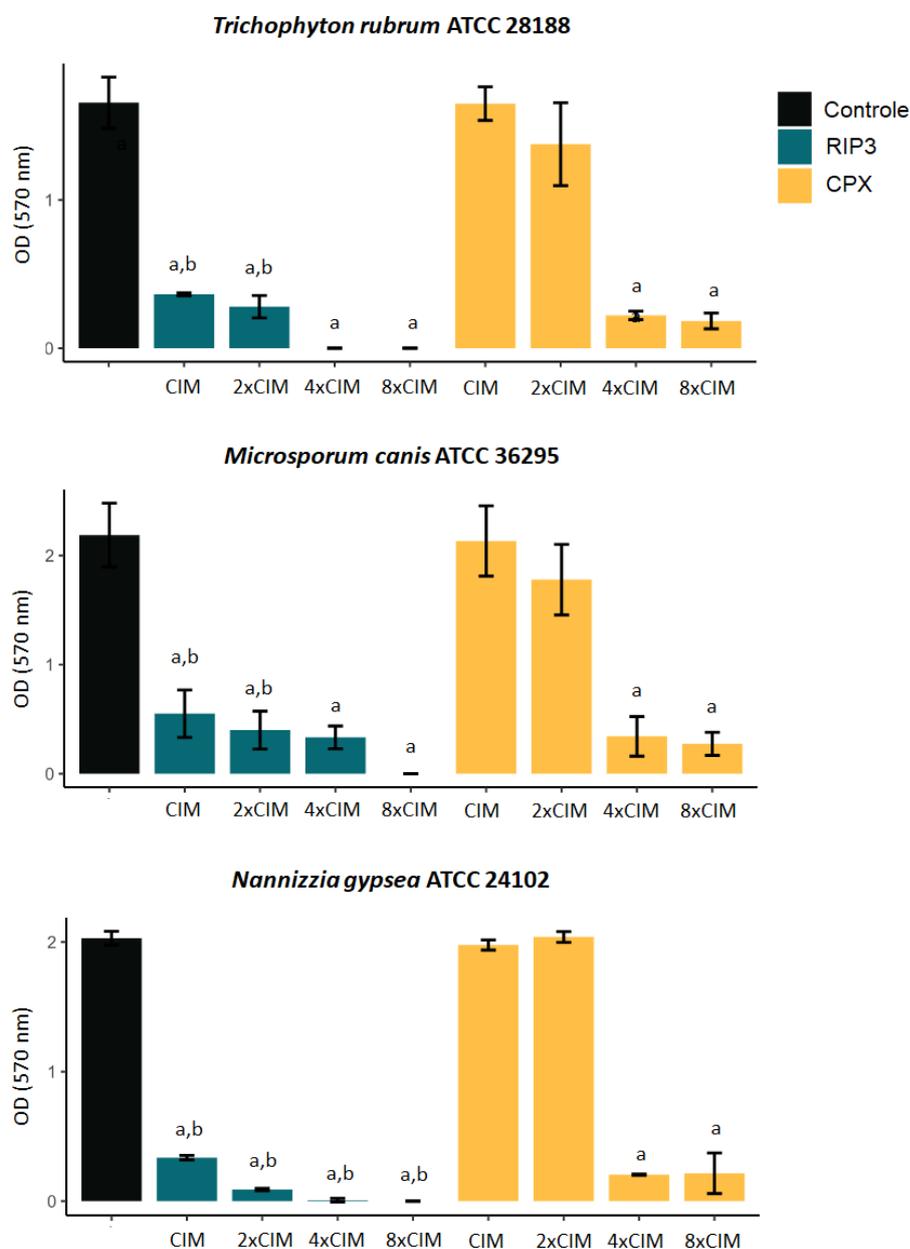
Dermatófitos	RIP3			NOR3	CPX			Produção de biofilme
	CIM	CFM	$\frac{CFM}{CIM}$	CIM	CIM	CFM	$\frac{CFM}{CIM}$	
<i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188	256	256	1	>1024	1	2	2	Forte
<i>Trichophyton rubrum</i> LM 03	128	128	1	>1024	1	2	2	Forte
<i>Trichophyton rubrum</i> LM 06	128	128	1	>1024	1	2	2	Moderado
<i>Trichophyton rubrum</i> LM 63	512	1024	2	>1024	1	2	2	Forte
<i>Trichophyton rubrum</i> LM 70	256	256	1	>1024	0,5	1	2	Forte
<i>Trichophyton rubrum</i> LM 176	256	256	1	>1024	0,5	1	2	Fraco
<i>Microsporum canis</i> ATCC 36295	128	1024	8	>1024	1	2	2	Moderado
<i>Microsporum canis</i> LM 177	128	512	4	>1024	1	2	2	Forte
<i>Microsporum canis</i> LM 186	128	512	4	>1024	1	2	2	Forte
<i>Microsporum canis</i> LM 216	128	128	1	>1024	1	2	2	Forte
<i>Microsporum canis</i> LM 232	128	256	2	>1024	1	2	2	Moderado
<i>Microsporum canis</i> LM 665	128	1024	8	>1024	2	2	1	Forte
<i>Nannizzia gypsea</i> ATCC 24102	256	512	2	>1024	2	2	1	Forte
<i>Nannizzia gypsea</i> LM 5	256	1024	4	>1024	2	2	1	Forte
<i>Nannizzia gypsea</i> LM 129	256	512	2	>1024	2	2	1	Forte
<i>Nannizzia gypsea</i> LM 130	256	1024	1	>1024	2	2	1	Moderado
<i>Nannizzia gypsea</i> LM 184	256	1024	4	>1024	2	32	16	Forte
<i>Nannizzia gypsea</i> LM 305	256	256	1	>1024	2	2	1	Moderado

CIM, concentração inibitória mínima; CFM, concentração fungicida mínima; RIP3, riparina 3; NOR3, nor-riparina 3; CPX, ciclopirox;

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

A quantificação da massa do biofilme *in vitro* na presença e ausência de drogas foi expressa em valores de densidade óptica (DO) em 570 nm (Figura 5). RIP3 inibiu significativamente a formação de biofilme por *T. rubrum*, *M. canis* e *N. gypsea* na CIM ( $p < 0,05$ ). Embora o CPX tenha valores de CIM muito mais baixos do que o RIP3 (Tabela 1), o CPX mostrou eficácia apenas em 4xCIM ( $p < 0,05$ ). A porcentagem média de inibição variou de 69 a 99% em relação ao controle.

**Figura 15** - Efeito da RIP3 na biomassa do biofilme *in vitro* de dermatófitos expressa como absorvância da coloração do cristal violeta.



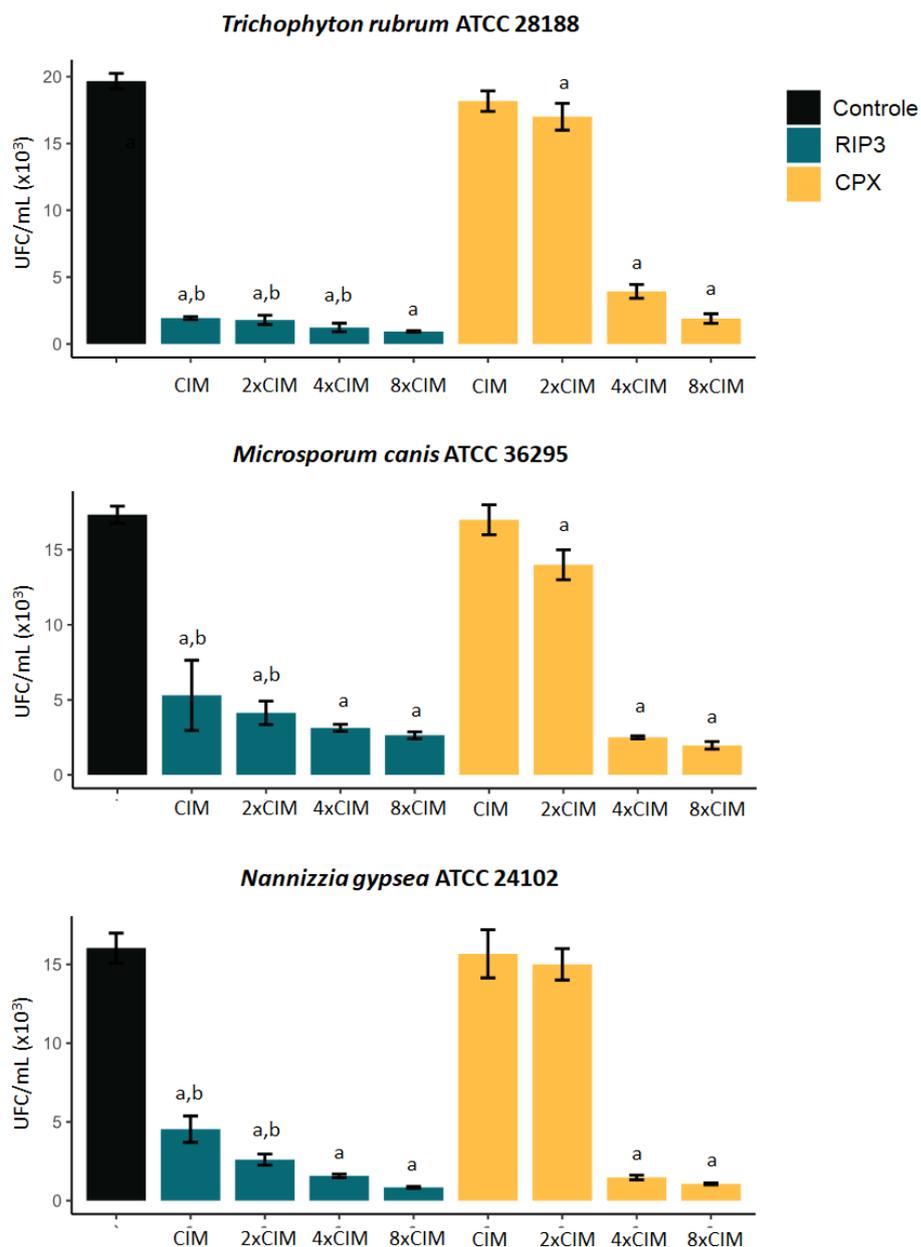
Os resultados são as médias  $\pm$  DP de três experimentos independentes. Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao controle de crescimento livre de drogas (a) e ao CPX no respectivo valor de CIM (b). OD, densidade óptica; CIM, concentração inibitória mínima; RIP3, riparina 3; CPX, ciclopirox.

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Analisou-se a viabilidade do biofilme *in vitro* por contagem de UFC; os dados são mostrados na Figura 6. Seguindo o padrão dos resultados encontrados no teste anterior, RIP3 reduziu significativamente a viabilidade do biofilme na CIM ( $p < 0,05$ ). O

CPX reduziu a viabilidade do biofilme, começando com 4xCIM ( $p < 0,05$ ). A porcentagem média de redução da viabilidade variou de 69 a 95% em relação ao controle.

**Figura 16** - Efeito da RIP3 na viabilidade de biofilmes *in vitro* de dermatófitos determinada pela quantificação 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 CPX no respectivo valor de CIM (b). OD, densidade óptica; CIM, concentração inibitória mínima; RIP3, riparina 3; CPX, ciclopirox.

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Avaliou-se o potencial antibiofilme da RIP3 usando modelos *ex vivo*, visualizando as estruturas sob microscopia de luz (Tabela 2) e quantificando o número de UFC (Figura 7). RIP3 e CPX em 4xCIM e 8xCIM inibiram visualmente o crescimento fúngico em fragmentos de unha (Tabela 2). RIP3 reduziu significativamente a viabilidade do biofilme *ex vivo* de *M. canis* e *N. gypsea* na CIM ( $p < 0,05$ ) (Figura 7). A viabilidade do biofilme de *T. rubrum* foi inibida em 2xCIM. A porcentagem média de redução da viabilidade variou de 50 a 98% em relação ao controle. No entanto, o RIP3 foi menos eficaz do que o CPX em seu respectivo valor CIM ( $p < 0,05$ ).

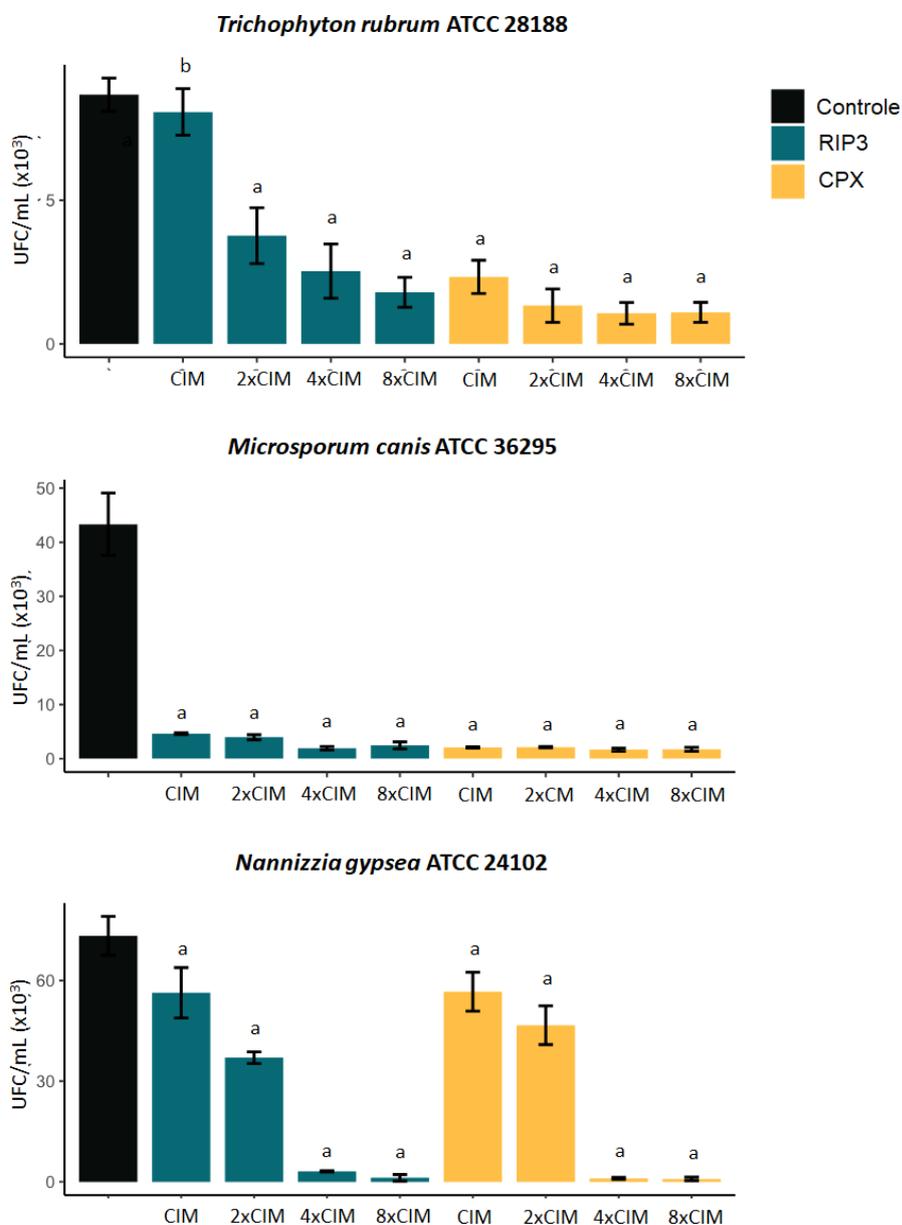
**Tabela 2** - Produção *ex vivo* de biofilme (fragmentos de unhas) por dermatófitos na ausência (controle) e na presença de RIP3.

Drogas	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Microsporium canis</i>	<i>Nannizzia gypsea</i>
	ATCC 28188	ATCC 36295	ATCC 24102
Controle	+++	+++	+++
RIP3 CIM	+	+	+
RIP3 2xCIM	+	+	+
RIP3 4xCIM	-	-	-
RIP3 8xCIM	-	-	-
CPX CIM	++	++	++
CPX 2xCIM	+	+	+
CPX 4xCIM	-	-	-
CPX 8xCIM	-	-	-

CIM, concentração inibitória mínima; RIP3, riparina 3; CPX, ciclopirox. +++ forte; ++ intermediário; + baixa; - ausente.

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

**Figura 17** - Efeito da RIP3 na viabilidade de biofilmes *ex vivo* (fragmentos de unha) de dermatófitos determinada pela quantificação do número de unidades formadoras de colônias (UFC).



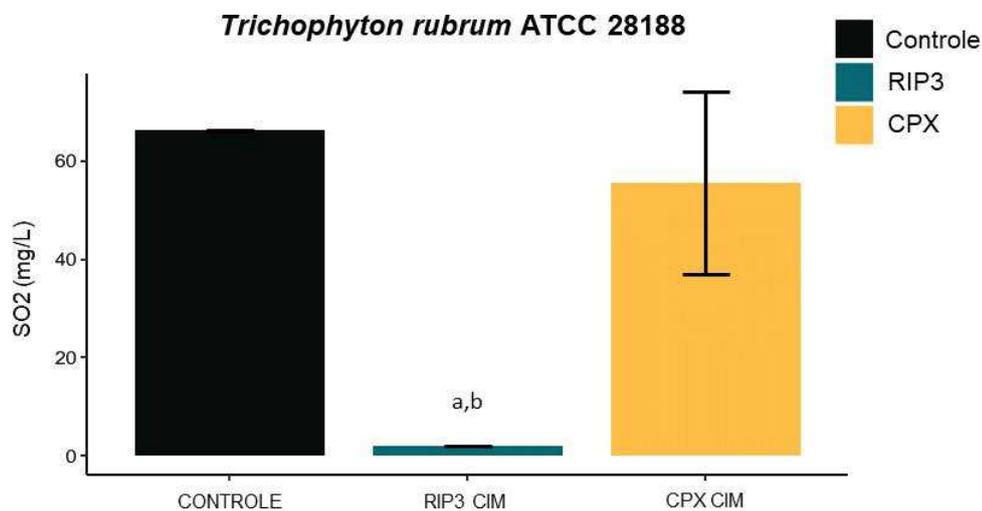
Os resultados são as médias  $\pm$  DP de três experimentos independentes. Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao controle de crescimento livre de drogas (a) e CPX no respectivo valor CIM (b). OD, densidade óptica; CIM, concentração inibitória mínima; RIP3, riparina 3; CPX, ciclopirox.

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Excluiu-se as cepas *M. canis* ATCC 36295 e *N. gypsea* ATCC 24102 na detecção do ensaio de sulfito porque elas não cresceram em meio M9 suplementado com L-cisteína. Dessa forma, o ensaio foi realizado com *T. rubrum* ATCC 28188. RIP3

inibiu significativamente a formação e liberação de sulfito ( $p < 0,05$ ) e foi mais potente que o CPX (Figura 8).

**Figura 18** - Efeito da riparina 3 na formação de sulfito por dermatófitos.



Os resultados são as médias  $\pm$  DP de três experimentos independentes. Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao controle de crescimento sem medicamento (a) e ao ciclopirox (b). CIM, concentração inibitória mínima; RIP3, riparina 3; CPX, ciclopirox.

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

## 6 DISCUSSÃO

A pesquisa por novos antifúngicos pode fornecer os avanços mais promissores nos próximos anos para o tratamento de dermatofitoses. Desta forma, os resultados do presente trabalho demonstraram que RIP3 apresentou atividade antifúngica contra cepas de dermatófitos como fungicida. Além disso, RIP3 também exerceu uma ação inibitória relevante sobre biofilmes de dermatófitos usando modelos experimentais *in vitro* (placas de poliestireno) e *ex vivo* (fragmentos de unha). Finalmente, o potencial antibiofilme de RIP3 está envolvido na inibição da secreção de sulfito.

Por outro lado, seu homólogo sintético NOR3 não apresentou atividade antifúngica. Esses resultados sugerem que a retirada de 1 carbono da molécula interfere a ação farmacológica. Achados semelhantes foram encontrados por Silva R. *et al.* (2023) ao analisar a atividade antidermatofítica da Riparina 1 (RIP1) e seus homólogos NOR1 e DINOR1. Na pesquisa, observaram que à medida que a cadeia alquílica diminuía, conseqüentemente, a droga perdia o potencial antifúngico. Segundo os autores, isso pode estar relacionado à maior constrição estérica ou à perda de lipofilicidade quando se retira um (NOR1) ou dois (DINOR1) carbonos da molécula, o que não ocorre com a RIP1, uma vez que possui um maior comprimento entre as porções p-metoxifenil e fenilamida, assim dispondo de maior liberdade de conformação e lipofilicidade.

Na literatura, não foi encontrado estudos descrevendo a atividade antifúngica da RIP3 e NOR3 contra dermatófitos. No entanto, descobriu-se que RIP3 mostrou melhor atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas do que bactérias Gram-negativas (Oliveira Júnior *et al.*, 2020). Em um estudo anterior, as cepas de *Staphylococcus aureus* foram mais sensíveis ao RIP3 do que as cepas de *Escherichia coli*, com halos de inibição de crescimento variando de 7 a 20 mm (Catão *et al.*, 2005). RIP3 também exibiu atividade antimicrobiana e promoveu alterações ultraestruturais em *S. aureus* e *Acinetobacter baumannii* multidrogas-resistentes (MDR) com CIM de 50 µg/mL e 400 µg/mL, respectivamente. Além disso, RIP3 mostrou potencial antibiofilme produzido por *S. aureus* MDR (Oliveira Júnior *et al.*, 2020).

Na presente pesquisa, RIP3 e CPX mostraram efeitos inibitórios contra cepas de dermatófitos. No entanto, as concentrações efetivas diferiram entre as drogas, e os valores de CIM de RIP3 foram maiores do que os de CPX. A maioria dos valores

de CIM de outros antifúngicos usados para tratar dermatofitose são geralmente baixos. Especificamente, estudos revelaram que a CIM de CPX varia de 0,25 a 8 mg/L (Curatolo *et al.*, 2021; Carmo *et al.*, 2022). Altas concentrações inibitórias podem levar a maior utilização de fármacos em formulações farmacêuticas e efeitos indesejáveis. Com base nessa observação, buscou-se pesquisas que analisassem a toxicidade da RIP3.

Até onde se tem conhecimento, não existem estudos sobre a segurança da RIP3 em seres humanos. No entanto, em pesquisas *in vitro*, RIP3 induziu citotoxicidade e hemólise semelhante à oxacilina e meropenem, dois antimicrobianos usados na prática clínica (Oliveira Júnior *et al.*, 2020). Em outro estudo realizado com embriões de *Gallus gallus*, foram observadas alterações morfológicas em todas as concentrações testadas de RIP3. No entanto, não houve mudanças nas funções das estruturas, que foram consideradas potencialmente seguras para gestantes (Lima *et al.*, 2017). Em camundongos, a administração de RIP3 via oral na dose de 1 g/kg não causou nenhuma morte durante 48h. Na dose de 500 mg/kg por via oral ou 35 mg/kg por via intraperitoneal, RIP3 não induziu alterações significativas nas funções centrais, autonômicas ou musculares esqueléticas dos camundongos. Contudo, RIP3 apresentou toxicidade intraperitoneal com LD50 de 104,2 mg/kg (Branco *et al.*, 2000).

Embora a RIP3 possa ser segura em ensaios de toxicidade celular, sua administração requer cautela quando administrada sistemicamente. A combinação de drogas pode reduzir esses efeitos e acelerar a melhora clínica e microbiológica (Brescini *et al.*, 2021). Combinações antifúngicas em dermatófitos têm despertado considerável interesse científico ao longo dos anos. No entanto, nenhum estudo se concentrou em combinações de RIP3 com drogas antifúngicas convencionais. Na literatura, apenas há estudos voltados para combinações com antibióticos, como o realizado por Oliveira Júnior *et al.* (2023), que observaram sinergismo entre RIP3 e colistina sobre isolados clínicos de *A. baumannii* MDR, reduzindo a CIM da colistina de 16 para 1 g/mL e induzindo alterações ultraestruturais *in vitro*. Além disso, foi evidenciado em outra pesquisa que a combinação entre RIP3 e colistina promoveu a inibição e a erradicação de biofilmes *in vitro* de *A. baumannii* MDR (Oliveira Júnior *et al.*, 2023a).

Considerando as evidências sobre a atividade farmacológica e segurança da RIP3, avançou-se nos estudos para avaliar atividade em modelos de biofilme *in vitro*

como uma primeira etapa antes de ensaios *ex vivo*. Uma revisão recente elencou as condições experimentais ideais para garantir a formação de biofilmes *in vitro* e *ex vivo*, a qual seguimos na presente pesquisa. Nessa revisão, diversos estudos destacaram que ensaios *in vitro* são um passo inicial importante para estudos de atividade antibiofilme contra dermatófitos. Entretanto, não há atividade antibiofilme de dermatófitos com RIP3, e há poucos estudos na literatura com produtos naturais. A maioria das pesquisas investigando a atividade antibiofilme *in vitro* em dermatófitos foi realizada com drogas convencionais, como terbinafina, griseofulvina, econazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol e ciclopirox. Comumente, as concentrações efetivas dessas drogas convencionais contra biofilmes de dermatófitos *in vitro* foram maiores do que a CIM (células planctônicas) (Pereira, 2021). No entanto, surpreendentemente, nosso estudo revelou efeitos inibitórios na formação e viabilidade do biofilme por RIP3 na CIM.

Uma vez constatada a atividade antibiofilme *in vitro* da RIP3, foi realizado ensaios utilizando fragmentos de unha humana como modelo de biofilme *ex vivo*. Modelos experimentais *ex vivo* são fundamentais para avaliação de novos fármacos, uma vez que tentam mimetizar condições *in vivo* (Machado *et al.*, 2021). Escolheu-se fragmentos de unhas humanas como modelo *ex vivo* com base em três pontos: (1) RIP3 mostrou toxicidade em modelos animais quando administrado por via intraperitoneal (Branco *et al.*, 2000); (2) o uso tópico de antifúngicos pode ser mais seguro do que a terapia oral (Gnat; Łagowski; Nowakiewicz, 2020); (3) o potencial uso tópico de formulações com RIP3 possibilita estudos futuros de terapia combinada (Gupta; Venkataraman; Quinlan, 2021). Os resultados da presente pesquisa mostram que RIP3 apresentou potencial inibição de biofilme, sendo esta uma possível opção para o tratamento de dermatofitoses tópicas.

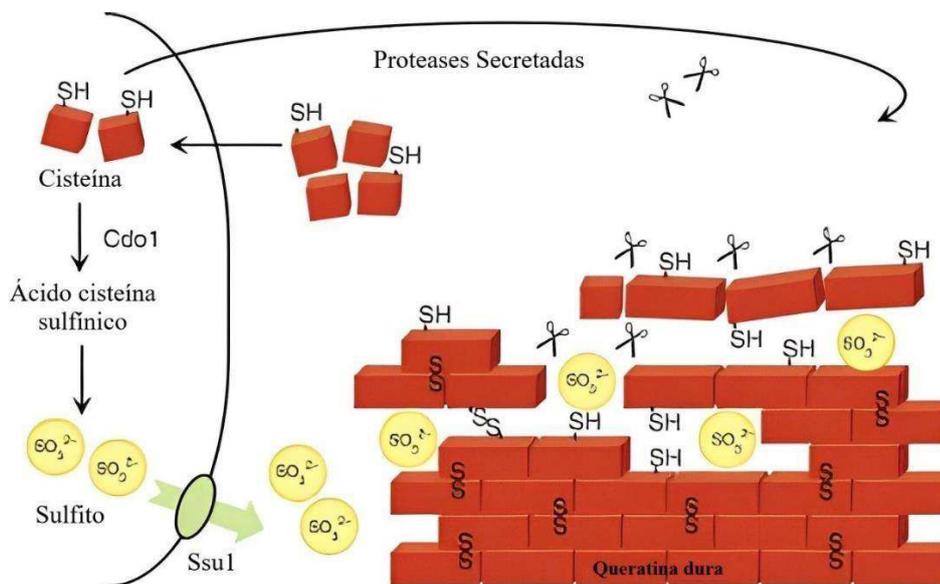
O papel do biofilme na etiopatogenia das dermatofitoses ungueais está relacionado à resistência a danos, podendo atuar como fonte constante de infecção, contribuindo para a resistência antifúngica. Além disso, os biofilmes fúngicos influenciam a permeação do tratamento tópico (Gupta; Daigle; Carviel, 2016). Portanto, é de relevância científica para um possível tratamento medicamentoso que também seja eficaz contra biofilmes de dermatófitos. Em uma revisão abrangente, Gupta; Venkataraman; Quinlan (2021) forneceram uma excelente atualização sobre agentes antifúngicos e novas formulações contra dermatófitos. Neste estudo,

observou-se que formulações tópicas para o tratamento da *tinea unguium*, como os esmaltes amorolfina 5% e ciclopirox 8%, são utilizadas há muito tempo. De fato, as formulações tópicas, como as formas de esmalte para unhas, melhoram a eficácia do tratamento por permanecerem em contato com a placa ungueal por longos períodos, liberando a droga no local infectado e atingindo os fungos em uma concentração efetiva (Costa *et al.*, 2022).

O estabelecimento e desenvolvimento dos biofilmes dependem de diversos fatores, incluindo fatores de virulência inerentes ao fungo. Dessa forma, os fatores de virulência de dermatófitos são outro alvo para avaliar a atividade de novas drogas, pois auxiliam os fungos no ataque ao tecido do hospedeiro. Com o potencial antibiofilme do RIP3 estabelecido, foi investigado se a RIP3 interfere com um fator de virulência vital envolvido na degradação da queratina do hospedeiro: produção e liberação de sulfitos. As proteases de dermatófitos queratinolíticos têm papel relevante na patogênese das dermatofitoses. Portanto, os dermatófitos precisam expressar proteases secretadas para quebrar as queratinas nos tecidos humanos para explorar essa fonte de nitrogênio e sobreviver (Lange; Huang; Busk, 2016).

A quebra da queratina nas placas ungueais depende da sulfitolise, processo que induz a quebra das pontes dissulfeto (S-S), alterando a conformação das queratinas e facilitando a ação da queratinase. Esse processo pode ocorrer por meio do sulfito, compostos que interagem com resíduos de cisteína nas queratinas e promovem reticulação (Navone; Speight, 2018). Anteriormente, Grumbt *et al.* (2013) propuseram que os dermatófitos secretam sulfitos através da bomba de efluxo Ssu1 durante o crescimento em um ambiente rico em cisteína. O excesso de cisteína livre pode ser tóxico para os fungos e para os tecidos do hospedeiro. No entanto, os fungos reutilizam o sulfito metabolizado como mecanismo de defesa (Figura 9). Neste estudo, usamos *T. rubrum* ATCC 28188 nesta etapa porque cresceu em meio M9 suplementado com L-cisteína.

**Figura 19** - Representação ilustrativa da degradação de queratina por dermatófitos.



Fonte: Adaptado de Grumbt *et al.* (2013)

Considerou-se essas premissas para argumentar que o mecanismo da atividade antibiofilme do RIP3 contra dermatófitos envolve a inibição da secreção de sulfito. Em primeiro lugar, foi confirmado que RIP3 possui atividade antibiofilme suportada por intensa atividade *in vitro* e *ex vivo* usando fragmentos de unha como fonte de queratina. Em segundo lugar, RIP3 diminuiu o crescimento fúngico de formação de sulfito em um ambiente rico em L-cisteína.

Para encontrar soluções práticas para o tratamento das dermatofitoses, é necessário compreender melhor os mecanismos envolvidos na infecção e na permeação dos medicamentos. Este estudo tenta superar esse cenário apresentando uma droga candidata efetiva no combate ao desenvolvimento de biofilme: RIP3. Fornecemos a hipótese inédita de que a ação antibiofilme do RIP3 envolve a inibição da secreção do agente redutor sulfito, o que pode prejudicar a progressão da degradação da queratina. O presente estudo é a primeira evidência que relata o potencial da RIP3 no controle de biofilmes de dermatófitos (Silva, E. *et al.*, 2023) (Anexo A).

## 7 CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou o potencial da RIP3 como um composto natural a ser utilizado no tratamento de dermatofitoses com menores chances de desenvolvimento de resistência, uma vez que foi comprovada a efetiva atividade antibiofilme *in vitro* e *ex vivo* da RIP3 contra cepas de dermatófitos clinicamente relevantes, e esta ação parece envolver a inibição da secreção de sulfito. Contudo, é pertinente ressaltar a importância de ampliar o número de cepas de dermatófitos e fatores de virulência para consolidar o mecanismo de interferência da RIP3 na formação de biofilmes. Portanto, esses resultados constituem um ponto de partida para futuras pesquisas usando RIP3 como protótipo de medicamento antifúngico.

## REFERÊNCIAS

ABDEL AZIZ, M.M.; AL-OMAR, M.S.; MOHAMMED, H.A.; EMAM, T.M. *In vitro* and *ex vivo* Antibiofilm Activity of a Lipopeptide Biosurfactant Produced by the Entomopathogenic *Beauveria bassiana* Strain against *Microsporum canis*. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, p. 232, 2020.

ALI, I.; SATTI, N.K.; DUTT, P.; PRASAD, R.; KHAN, I.A. Hydroxychavicol: A Phytochemical Targeting Cutaneous Fungal Infections. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 37867, 2016.

ANDRADE JÚNIOR, F.P.D.; SOUZA, H.D.D.S.; CORDEIRO, L.V.; SILVA, D.D.F.; LIMA, E.D.O. *Microsporum* spp como causador de dermatofitoses: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 5, p. e133953194-e133953194, 2020.

BARBOSA FILHO, J.M.; SILVA, E.C.; BHATTACHARYYA, J. Synthesis of Several New Phenylethylamines of Substituted Benzoic Acids. **Química Nova**, v. 13, p. 332–334, 1990.

BARBOSA FILHO, J.M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O.R.; BARBOSA, R.D.C.S.B.C.; GIESBRECHT, A.M.; YOUNG, M.C.M. Esters and Amides, Styrylpyrones and Neolignans from the Fruits of *Aniba riparia*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 9, p. 2615-2617, 1987.

BRESCINI, L.; FIORITI, S.; MORRONI, G.; BARCHIESI, F. Antifungal Combinations in Dermatophytes. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 9, p. 727, 2021.

BRILHANTE, R.S.N.; CORREIA, E.E.M.; GUEDES, G.M.D.M.; OLIVEIRA, J.S.D; BRANCO, D.D.S.C.M.C.; CORDEIRO, R.D.A.; PINHEIRO, A.D.Q.; CHAVES, L.J.Q.; PEREIRA NETO, W.D.A.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. *In vitro* Activity of Azole Derivatives and Griseofulvin against Planktonic and Biofilm Growth of Clinical Isolates of Dermatophytes. **Mycoses**, v. 61, n. 7, p. 449-454, 2018.

BRILHANTE, R.S.N.; CORREIA, E.E.M.; GUEDES, G.M.D.M.; PEREIRA, V.S.; OLIVEIRA, J.S.D; BANDEIRA, S.P.; ALENCAR, L.P.D; ANDRADE, A.R.C.D.; BRANCO, D.D.S.C.M.C.; CORDEIRO, R.D.A.; PINHEIRO, A.D.Q.; CHAVES, L.J.Q.; PEREIRA NETO, W.D.A.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. 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, 2017.

BURKHART, C.N.; BURKHART, C.G.; GUPTA, A.K. Dermatophytoma: recalcitrance to treatment because of existence of fungal biofilm. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 47, n. 4, p. 629-631, 2002.

CARMO, P.H.F.; FREITAS, G.J.C.; DORNELAS, J.C.M.; ALMEIDA, B.C.T.; BALTAZAR, L.M.; FERREIRA, G.F.; PERES, N.T.A.; SANTOS, D.A. Reactive Oxygen and Nitrogen Species Are Crucial for the Antifungal Activity of Amorolfine

and Ciclopirox Olamine against the Dermatophyte *Trichophyton interdigitale*. **Medical Mycology**, v. 60, n. 8, p. 58, 2022.

BRANCO, U.V.C.; BRANCO, U.J.V.C.; THOMAS, G.; ARAUJO, C.C.; BARBOSA FILHO, J.M. Preliminary Pharmacological Studies on Three Benzoyl Amides, Constituents of *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 19, n. 3, p. 197-202, 2000.

CATÃO, R.M.R.; BARBOSA FILHO, J.M.; GUTIERREZ, S.J.C.; LIMA, E.D.O.; PEREIRA, M.D.S.V.; ARRUDA, T.A.; ANTUNES, R.M.P. Avaliação Da Atividade Antimicrobiana de Riparinas Sobre Cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* Multirresistentes. **Revista Brasileira Análises Clínicas**, p. 247-249, 2005.

CHANYACHAILERT, P.; LEEYAPHAN, C.; BUNYARATAVEJ, S. Cutaneous Fungal Infections Caused by Dermatophytes and Non-Dermatophytes: An Updated Comprehensive Review of Epidemiology, Clinical Presentations, and Diagnostic Testing. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 6, p. 669, 2023.

CHEN, B.; SUN, Y.; ZHANG, J.; CHEN, R.; ZHONG, X.; WU, X.; ZHENG, L.; ZHAO, J. *In vitro* Evaluation of Photodynamic Effects against Biofilms of Dermatophytes Involved in Onychomycosis. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 1228, 2019.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi**. 3rd ed. CLSI standard M38. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2017.

CORDEIRO, R.D.A.; OLIVEIRA, J.S.; BRANCO, D.D.S.C.M.C.; TEIXEIRA, C.E.C.; MARQUES, F.J.D.F.; BITTENCOURT, P.V.; CARVALHO, V.L.; BANDEIRA, T.D.J.P.G.; BRILHANTE, R.S.N.; MOREIRA, J.L.B.; PEREIRA NETO, W.D.A.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. *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, P.d.S.; MENDES, V.; VEIGA, F.F.; NEGRI, M.; SVIDZINSKI, T.I.E. Relevant Insights into Onychomycosis' Pathogenesis Related to the Effectiveness Topical Treatment. **Microbial Pathogenesis**, v. 169, p. 105640, 2022.

COSTA-ORLANDI, C.B.; SARDI, J.C.O.; SANTOS, C.T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; MENDES, M. *In vitro* Characterization of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* Biofilms. **Biofouling**, v. 30, n. 6, p. 719-727, 2014.

CURATOLO, R.; JURICEVIC, N.; LEONG, C.; BOSSHARD, P.P. Antifungal Susceptibility Testing of Dermatophytes: Development and Evaluation of an Optimised Broth Microdilution Method. **Mycoses**, v. 64, n. 3, p. 282-291, 2021.

DE HOOG, G. S.; DUKIK, C.; MONOD, M.; PACKEU, A.; STUBBE, D.; HENDRICKX, M.; KUPSCH, C.; STIELOW, J.B.; FREEKE, J.; GOKER, J.; REZAEI-MATEHKOALEI, A.; MIRHENDI, H.; GRASER, Y. Toward a Novel Multilocus

Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 182, n. 1–2, p. 5–31, 1 fev. 2017.

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

GNAT, S.; ŁAGOWSKI, D.; NOWAKIEWICZ, A. Major challenges and perspectives in the diagnostics and treatment of dermatophyte infections. **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, p. 212 – 232, 2020.

GNAT, S.; NOWAKIEWICZ, A.; ZIĘBA, P. Taxonomy of Dermatophytes—The Classification Systems May Change but the Identification Problems Remain the Same. **Postępy Mikrobiologii-Advancements of Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 49-58, 2019.

GRUMBT, M.; MONOD, M.; YAMADA, T.; HERTWECK, C.; KUNERT, J.; STAIB, P. Keratin Degradation by Dermatophytes Relies on Cysteine Dioxygenase and a Sulfite Efflux Pump. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 6, p. 1550-1555, 2013.

GUPTA, A.K.; DAIGLE, D.; CARVIEL, J.L. The Role of Biofilms in Onychomycosis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 74, n. 6, p. 1241-1246, 2016.

GUPTA, A.K.; FOLEY, K.A.; VERSTEEG, S.G. New Antifungal Agents and New Formulations Against Dermatophytes. **Mycopathologia**, n. 182, p. 127–141, 2017.

GUPTA, A.K.; VENKATARAMAN, M.; QUINLAN, E.M. New Antifungal Agents and New Formulations Against Dermatophytes. **Dermatophytes and Dermatophytoses**, p. 433-471, 2021.

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, p. S37-S41, 1998.

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

KREIJKAMP-KASPERS, S.; HAWKE, K.; GUO, L.; KERIN, G.; BELL-SYER, S.E.M.; MAGIN, P.; BELL-SYER, S.V.; VAN DRIEL, M.L. Oral Antifungal Medication for Toenail Onychomycosis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 7, 2017.

LANGE, L.; HUANG, Y.; BUSK, P.K. Microbial Decomposition of Keratin in Nature—A New Hypothesis of Industrial Relevance. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 5, p. 2083-2096, 2016.

LEE, Y.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Molecular mechanisms governing antifungal drug resistance. **npj Antimicrobials and Resistance**, v. 1, n. 1, p. 5, 2023.

LIMA, L.S.D.; BARBOSA FILHO, J.M.; GUTIÉRREZ, S.J.C.; LIMA, R.M.P.L.D.; MEDEIROS, P.L.D.; SILVA, E.C.D. Riparin III Effect on the Development of Neural Tube Embryos of *Gallus gallus*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 11, n. 14, p. 178-185, 2017.

MACHADO, G. R. M., G.; PIPPI, B.; BERLITZ, S.; DIEDRICH, D.; DEFFERRARI, D.; LOPES, W.; BAGGIO GNOATTO, S.C.; KULKAMP-GUERREIRO, I.C.; VAINSTEIN, M.H.; JEAN, M.; WEGHE, P.V.D.; ANDRADE, S.F.D.; FUENTEFRIA, A.M. *Ex vivo* Potential of a Quinoline-Derivative Nail Lacquer as a New Alternative for Dermatophytic Onychomycosis Treatment. **Journal of Medical Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 001314, 2021.

MARKANTONATOU, A.M.; SAMARAS, K.; VYZANTIADIS, T.A. Dermatophytic Biofilms: Characteristics, Significance and Treatment Approaches. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 2, p. 228, 2023.

MARTINEZ-ROSSI, N.M.; PERES, N.T.A.; ROSSI, A. Pathogenesis of Dermatophytosis: Sensing the Host Tissue. **Mycopathologia**, v. 182, p. 215–227, 2017.

MELO, C.T.V.D.; MONTEIRO, A.P.; LEITE, C.P.; ARAÚJO, F.L.O.D.; LIMA, V.T.M.; BARBOSA FILHO, J.M.; FONTELES, M.M.D.F.; VASCONCELOS, S.M.M.D.; BARROS VIANA, G.S.D.; SOUSA, F.C.F.D. Anxiolytic-like Effects of (O-Methyl)-N-2,6-Dihydroxybenzoyl-Tyramine (Riparin III) from *Aniba Riparia* (NEES) MEZ (Lauraceae) in Mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 3, p. 451-454, 2006.

NARANG, T.; BHATTACHARJEE, R.; SINGH, S.; JHA, K.; KAVITA, K.; MAHAJAN, R.; DOGRA, S. Quality of life and psychological morbidity in patients with superficial cutaneous dermatophytosis. **Mycoses**, v. 62, n. 8, p. 680–685, 2019.

NAVONE, L.; SPEIGHT, R. Understanding the Dynamics of Keratin Weakening and Hydrolysis by Proteases. **PLoS One**, v. 13, n. 8, p. e0202608, 2018.

NOOR, F.; QAMAR, M.T.U.; ASHFAQ, U.A.; ALBUTTI, A.; ALWASHMI, A.S.S.; ALJASIR, M.A. Network Pharmacology Approach for Medicinal Plants: Review and Assessment. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 5, p. 572, 2022.

OLIVEIRA, D.K.; CARDOSO, A.M. Biofilmes microbianos: um desafio para a saúde. **NewsLab**. 2018.

OLIVEIRA JÚNIOR, J.B.; DA SILVA, E.M.; VERAS, D.L.; RIBEIRO, K.R.C.; FREITAS, C.F.; LIMA, F.C.G.; GUTIERREZ, S.J.C.; CAMARA, C.A.; BARBOSA FILHO, J.M.; ALVES, L.C.; BRAYNER, F.A. 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, 2020.

OLIVEIRA JÚNIOR, J.B.; LIMA, F.C.G.D.; FIRMO, E.F.; ROCHA, D.A.M.D.; SANDES, J.M.; GUTIERREZ, S.J.C.; CAMARA, C.A.; BARBOSA FILHO, J.M.; ALVES, C.A.;

BRAYNER, F.A. *In vitro* activity of riparin III in combination with antimicrobials against multidrug-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii*. **Phytomedicine Plus**, v. 3, n. 1, p. 100414, 2023.

OLIVEIRA JÚNIOR, J.B.; ROCHA, D.A.M.D.; LIMA, F.C.G.D.; HIGINO, T.M.M.; GUTIERREZ, S.J.C.; CAMARA, C.A.; BARBOSA FILHO, J.M.; ALVES, L.C.; BRAYNER, F.A. *In vitro* inhibition and eradication of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* biofilms by riparin III and colistin combination. **Microbial Pathogenesis**, v. 182, p. 106233, 2023a.

PEREIRA, F. D. O.; GOMES, S.M.; SILVA, S.L.; TEIXEIRA, A.P.d.C; LIMA, I.O. The Prevalence of Dermatophytoses in Brazil: A Systematic Review. **Journal of Medical Microbiology**, v. 3, pág. 13-21, 2021.

PEREIRA, F.D.O. A Review of Recent Research on Antifungal Agents against Dermatophyte Biofilms. **Medical Mycology**, v. 59, n. 4, p. 313-326, 2021.

QUADROS, A.U.D.; BINI, D.; PEREIRA, P.A.T.; MORONI, E.G.; MONTEIRO, M.C. Antifungal Activity of Some Cyclooxygenase Inhibitors on *Candida albicans*: PGE2-Dependent Mechanism. **Folia microbiologica**, v. 56, p. 349-352, 2011.

RODRÍGUEZ, N.; VÉLEZ, C.; CASTRO, N. Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos. **CES Medicina**, v. 26, n. 1, p. 43-55, 2012.

ROUZAUD, C.; LANTERNIER, F.; PUEL, A. Primary Immunodeficiencies and Dermatophytosis. **Immunogenetics of Fungal Diseases**, p. 121-133, 2017.

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.

SANTOS, S.G.D; GOMES, I.F.; GOLZIO, A.M.F.D.O; SOUTO, A.L; SCOTTI, M.T; TAVARES, J.F; GUTIERREZ, S.J.C; ALMEIDA, R.N.D; BARBOSA FILHO, J.M.; SILVA, M.S.D. Psychopharmacological Effects of Riparin Iii from *Aniba Riparia* (Nees) Mez. (Lauraceae) Supported by Metabolic Approach and Multivariate Data Analysis. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 20, n. 1, p. 1-13, 2020.

SIDRIM, J, J, C.; ROCHA, M, F, G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

SILVA, E.P.; ROCHA, M.A.N.D.; SILVA, R.N.M.; MENDES, J.M.; RIBEIRO FILHO, J.; SOUSA, G.R.; SOUZA-FERRARI, J.; BARBOSA FILHO, J.M.; PEREIRA, F.D.O. Antifungal and Antibiofilm Activity of Riparin III against Dermatophytes. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 2, p. 231, 2023.

SILVA, R.N.M.; ROCHA, M.A.N.D.; SILVA, E.P.; MENDES, J.M.; RIBEIRO FILHO, J.; SOUSA, G.R.; SOUZA-FERRARI, J.; BARBOSA FILHO, J.M.; PEREIRA, F.D.O.

*In vitro* and *ex vivo* antibiofilm activity of riparin 1, and its nor and dinor homologs, against dermatophytes. **Mycologia**, v. 115, n. 2, p. 206-215, 2023.

VASCONCELOS, A.S.; OLIVEIRA, I.C.M.; VIDAL, L.T.M.; RODRIGUES, G.C.; GUTIERREZ, S.J.C.; BARBOSA FILHO, J.M.; VASCONCELOS, S.M.M.; FONTELES, M.M.D.F.; GASPAR, D.M.; SOUSA, F.C.F.D. Subchronic Administration of Riparin III Induces Antidepressive-like Effects and Increases BDNF Levels in the Mouse Hippocampus. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 29, n. 4, p. 394-403, 2015.

## APÊNDICE A



**Ministério do Meio Ambiente**  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**  
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Certidão**  
**Cadastro nº AECBD36**

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **AECBD36**  
 Usuário: **Fillipe de Oliveira Pereira**  
 CPF/CNPJ: **009.752.504-93**  
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**  
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

#### Espécie

**Microsporium canis**  
**Trichophyton rubrum**

Título da Atividade: **Estudo farmacológico de riparinas naturais e Nor- e Dinor-riparinas sintéticas sobre fungos dermatófitos**

#### Equipe

<b>Fillipe de Oliveira Pereira</b>	<b>UFCG</b>
<b>Ânderson de Vasconcelos Pinto</b>	<b>ufcg</b>

Data do Cadastro: **19/05/2021 10:38:18**  
 Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **16:18** de **18/08/2023**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
 ASSOCIADO - **SISGEN**

## APÊNDICE B

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



### 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 (UFCG) 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  
**Telefone:** (83)3372-1835 **E-mail:** cep.ces.ufcg@gmail.com

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



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:

E 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:** CUIUTE  
**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:** CUIUTE  
**Telefone:** (83)3372-1835 **E-mail:** cep.ces.ufcg@gmail.com

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



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:**  
**Glucia Veríssimo 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:** CUITE  
**Telefone:** (83)3372-1835 **E-mail:** cep.ces.ufcg@gmail.com

## ANEXO A



Article

## Antifungal and Antibiofilm Activity of Riparin III against Dermatophytes

Emanuel Pereira Silva <sup>1</sup>, Marcelo Antônio Nóbrega da Rocha <sup>1</sup>, Risley Nikael Medeiros Silva <sup>1</sup>, Juliana Moura-Mendes <sup>2</sup>, Gabriela Ribeiro de Sousa <sup>3</sup>, Jailton de Souza-Ferrari <sup>4</sup>, José Maria Barbosa-Filho <sup>3</sup>, Edeltrudes de Oliveira Lima <sup>5</sup> and Fillipe de Oliveira Pereira <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Fungi Research Group, Biochemistry Laboratory, Academic Unit of Health, Education and Health Center, Federal University of Campina Grande, Cuité 58175-000, PB, Brazil
  - <sup>2</sup> Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas, Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo 111421, Paraguay
  - <sup>3</sup> Postgraduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products, Pharmaceutical Sciences Department, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil
  - <sup>4</sup> Department of Chemistry, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil
  - <sup>5</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil
- \* Correspondence: fillipe.oliveira@professor.ufcg.edu.br

**Abstract:** The ability of dermatophytes to develop biofilms is possibly involved in therapeutic failure because biofilms impair drug effectiveness in the infected tissues. Research to find new drugs with antibiofilm activity against dermatophytes is crucial. In this way, riparins, a class of alkaloids that contain an amide group, are promising antifungal compounds. In this study, we evaluated the antifungal and antibiofilm activity of riparin III (RIP3) against *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, and *Nannizzia gypsea* strains. We used ciclopirox (CPX) as a positive control. The effects of RIP3 on fungal growth were evaluated by the microdilution technique. The quantification of the biofilm biomass in vitro was assessed by crystal violet, and the biofilm viability was assessed by quantifying the CFU number. The ex vivo model was performed on human nail fragments, which were evaluated by visualization under light microscopy and by quantifying the CFU number (viability). Finally, we evaluated whether RIP3 inhibits sulfite production in *T. rubrum*. RIP3 inhibited the growth of *T. rubrum* and *M. canis* from 128 mg/L and *N. gypsea* from 256 mg/L. The results showed that RIP3 is a fungicide. Regarding antibiofilm activity, RIP3 inhibited biofilm formation and viability in vitro and ex vivo. Moreover, RIP3 inhibited the secretion of sulfite significantly and was more potent than CPX. In conclusion, the results indicate that RIP3 is a promising antifungal agent against biofilms of dermatophytes and might inhibit sulfite secretion, one relevant virulence factor.

**Keywords:** riparin; dermatophytes; ex vivo; sulfites; antifungal; fungicide; alkamides



**Citation:** Silva, E.P.; Rocha, M.A.N.d.; Silva, R.N.M.; Moura-Mendes, J.; Sousa, G.R.d.; de Souza-Ferrari, J.; Barbosa-Filho, J.M.; Lima, E.d.O.; Pereira, F.d.O. Antifungal and Antibiofilm Activity of Riparin III against Dermatophytes. *J. Fungi* **2023**, *9*, 231. <https://doi.org/10.3390/jof9020231>

Academic Editors: Pietro Nenoff, Philipp P. Bosshard and Yvonne Gräser

Received: 24 November 2022

Revised: 7 February 2023

Accepted: 8 February 2023

Published: 9 February 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### 1. Introduction

Dermatophytoses are mycoses caused by fungi called dermatophytes, divided into seven main clades with the genera *Arthroderma*, *Lophophyton*, *Microsporum*, *Paraphyton*, *Nannizzia*, *Epidermophyton*, and *Trichophyton* [1]. Dermatophytes infect humans of all ages, races, genders, and socioeconomic statuses worldwide. *Tinea pedis* and *tinea corporis* have become the principal clinical forms worldwide. *Trichophyton rubrum* predominates globally in cases of *tinea pedis* and *tinea unguium* [2]. Specifically in Brazil, *tinea unguium* (toenails and fingernails) is the most frequent dermatophytosis. *Trichophyton rubrum*, *M. canis*, and *N. gypsea* have become the major species [3]. Although dermatophytosis is generally restricted to the surface of the skin tissue, fungi can be invasive and cause a deep and widespread infection in patients with autosomal recessive CARD9 deficiency or HIV immunodeficiency or even in patients with unknown immunodeficiency [4,5].