APLICAÇÃO DE MODELOS ALTERNATIVOS PARA AVALIAR A EFICÁCIA E EFICIÊNCIA DE POTENCIAIS FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DE DERMATOMICOSES

Vinicius Alexandre[1] (PIBIC/UEM), Joana Gomes Vieira[1], Marcos Luciano Bruschi[2], Melyssa Fernanda Norman Negri Grassi[1] (Orientadora). E-mail: mfnngrassi2@uem.br

[1]Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Maringá, PR.
[2]Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia, Máringa, PR.

Área e subárea do conhecimento: Microbiologia /Micologia

Palavras-chave: fungo, produto natural, modelo alternativo

RESUMO

Os agentes causadores de dermatofitoses são classificados como queratinofílicos, acometendo pele, pelo e unha dos hospedeiros e, somado a isso, o tratamento antifúngico pode não ser eficaz com diversos efeitos colaterais. O própolis surge como um produto natural alternativo para a terapêutica levando em conta seu baixo custo e propriedades farmacológicas. Para avaliar a ação de compostos antifúngicos e a virulência de fungos, larvas de *Tenebrio molitor* representam um potencial modelo alternativo frente aos murinos. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi aplicar modelos alternativos para avaliar a eficiência de potenciais fármacos frente fungos causadores de dermatomicoses. Primeiramente, foi avaliada a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do própolis glicólico frente a quatro isolados fúngicos, determinada a dose letal 50 (DL50) em *T. molitor* e por fim, realizada a infecção e tratamento dos insetos. Como resultado a CIM mostrou-se eficaz com variação de 1,87 a 7,5% do própolis, enquanto a CFM em maiores concentrações com variação de 7,5 a 15%. A concentração de 3,75% do produto foi considerada não tóxica para as larvas, entretanto esta concentração não foi eficaz para o tratamento, sendo observado a morte das larvas pela infecção fúngica. Diante os resultados é possível observar que larva de *T. molitor* é um interessante modelo alternativo para estudos *in vivo* tanto para avaliar infecção fúngica quanto para determinar a dose letal e tratamento.

INTRODUÇÃO

Dermatomicoses englobam diversas doenças que acometem principalmente pele, pelo e unha, causadas por fungos denominados queratinofílicos, ou seja, possuem a capacidade de degradar queratina destes sítios anatômicos e são divididos em fungos dermatófitos, leveduras e fungos filamentosos não dermatófitos (DE PAULA

et al., 2021). O desenvolvimento de mecanismos de resistência para algumas espécies de fungos têm sido preocupante, uma vez que o tratamento antifúngico geralmente é agressivo, tóxico e pode ser ineficiente. O própolis é uma importante alternativa terapêutica do ponto de vista econômico por ser de fácil obtenção e por apresentar inúmeras propriedades antifúngicas (DO NASCIMENTO, DE FRANÇA VERAS, 2020).Os insetos estão ganhando destaque como hospedeiros modelo para estudar infecções microbianas, trazendo vantagens éticas, econômicas e de logística frente aos modelos murinos. Dentre os insetos, larvas de *Tenebrio molitor* representam um potencial hospedeiro invertebrado que poderia ser usado para estudar a virulência de fungos e a ação de compostos antifúngicos, uma vez que possui um sistema imunológico inato complexo (DE SOUZA, 2018). Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi realizar testes de virulência em fungos causadores de dermatomicoses com aplicação de modelos alternativos para avaliar a eficácia e eficiência de potenciais fármacos para tratamento de dermatomicoses.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolados clínicos
Para este estudo, foram utilizados isolados de *Candida albicans* (CMRP 3480), *Fusarium oxysporum* (CMRP 2925), *Fusarium solani* (CMRP 5665) e *Trichophyton mentagrophytes* (CMRP 2921).

Extrato de própolis e seus derivados
Foi utilizado neste trabalho extrato glicólico de própolis alpino 30% (m/m), gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Marcos Luciano Bruschi.

Ensaios in vitro
Após a obtenção do extrato de própolis glicólico, foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) frente aos isolados causadores de dermatomicose.

Determinação de DL50 (dose letal 50% - dose que mata 50% dos animais) em modelo de Tenebrio molitor *do extrato de própolis*
Preparou-se a diluição seriada do própolis (puro, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32) aplicando 5µL nas diferentes concentrações em cada larva, totalizando 5 insetos por grupo. As diluições seriadas do própolis e salina (controle negativo) foram usadas para avaliar a toxicidade ao *T. molitor* e calcular a DL50. O número de insetos mortos foi monitorado uma vez ao dia durante 5 dias consecutivos, verificado visualmente a melanização e a resposta a estímulos físicos.

Infecção e tratamento em modelos in vivo
A infecção e o tratamento das larvas de *T. molitor* foram feitos utilizando o inóculo preparado para cada espécie de fungo, em um total de 5 larvas por grupo. Cada larva recebeu um total de 5µL de inóculo na concentração de 1,0 - 5,0×10^4 células

fúngicas suspensas em salina. Após a infecção, as larvas receberam 5µL em dose única de própolis, na concentração determinada previamente pelo teste de suscetibilidade. O controle positivo foi constituído de apenas larvas com inóculo fúngico e o controle negativo por apenas salina estéril. O número de insetos mortos foi monitorado uma vez ao dia durante 5 dias consecutivos, verificado visualmente a melanização e a resposta a estímulos físicos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram avaliadas as propiedades antifúngicas do extrato de própolis glicólico frente aos isolados clínicos causadores de dermatomicoses utilizando modelos alternativos. As CIM com variação de 1,87 a 7,5% e CFM com variação de 7,5 a 15% encontradas referentes aos isolados fúngicos estão descritas na tabela 1. Em relação a determinação da DL50, o fármaco não foi tóxico na concentração de 3,75% quando inoculado nas larvas de *T. molitor*, no entanto ao realizar a infecção com inóculo fúngico e posterior tratamento nesta mesma concentração não tóxica, o derivado de própolis não teve atividade antifúngica, observando a morte dos insetos. Diante dos resultados obtidos, foi possível notar que o glicólico de própolis em menores concentrações possui ação fungistática e em maiores concentrações atividade fungicida. Estes resultados corroboram com os achados de CORRÊA *et al*. (2020), em que foi avaliado a ação de extratos de própolis frente a isolados de *Candida albicans,* sugerindo que o própolis possui mecanismo de ação fungistático dependente da dose e do tempo, reforçando a necessidade de reaplicação do mesmo para manter sua atividade antifúngica característica. O uso de *T. molitor* como hospedeiro alternativo necessita de maiores estudos, uma vez que apresenta vantagens a outros modelos alternativos como em relação à *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta) e *Caenorhabditis elegans* (nematóide), pois esses insetos não toleram a faixa de temperatura entre 25 °C e 37 °C, ideal para estudo de fungos filamentosos e leveduras. Além disso, diferentemente de *Galleria mellonella*, as larvas de *T. molitor* são comercializadas no Brasil e são mais fáceis de cultivar em laboratório. Assim, considera-se um modelo alternativo valioso, mas todo o seu potencial ainda não foi alcançado (DE SOUZA, 2015).

Tabela 1: CIM e CFM em relação a concentração do extrato de própolis

Espécie fúngica	CIM	CFM
Candida albicans	7,5%	15%
Fusarium oxysporum	1,87%	7,5%
Fusarium solani	1,87%	15%
Trichophyton mentagrophytes	1,87%	7,5%

CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a partir da avaliação *in vitro* através da determinação da CIM e CFM, somado a aplicação do modelo alternativo *in vivo* de larvas de *T. Molitor* o própolis glicólico teria um potencial fungistático frente aos agentes causadores de dermatomicose.

AGRADECIMENTOS

Ao laboratório de Micologia Médica da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e às agencias de formento CNPq-Fundação Araucária-UEM.

REFERÊNCIAS

CORRÊA, Jakeline L. *et al*. Propolis extract has bioactivity on the wall and cell membrane of *Candida albicans*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 256, n. 256 p. 112791, 2020. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874119349682?via%3Dihub. Acesso em: 26 ago. 2023.

DE SOUZA, Patrícia Canteri *et al*. An invertebrate host to study fungal infections, mycotoxins and antifungal drugs: *Tenebrio molitor*. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 4, p. 125, 2018. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6308941/ Acesso em: 26 ago. 2023.

DE SOUZA, Patrícia Canteri *et al*. *Tenebrio molitor* (*Coleoptera: Tenebrionidae*) as an alternative host to study fungal infections. **Journal of microbiological methods**, v. 118, n. 118 p. 182-186, 2015. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701215300828?via%3Dihub. Acesso em: 26 ago. 2023.

DE PAULA, Júlia *et al*. Potencial ação de extratos de plantas na onicomicose causada por *Trichophyton rubrum*: Uma revisão integrativa. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 2, p. 7660-7677, 2021. Disponível em: https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJHR/article/view/27832. Acesso em 26 ago. 2023.

DO NASCIMENTO, Gyzelle Pereira Vilhena; DE FRANÇA VERAS, Tatiana. Atividade antimicrobiana e antifúngica de amostras comerciais de extrato alcoólico de própolis verde e própolis vermelho contra cepas causadoras de lesões cutâneas. **REVISTA IBERO-AMERICANA DE PODOLOGIA**, v. 2, n. 2, p. 182-189, 2020. Disponível em: https://iajp.com.br/index.php/IAJP/article/view/33. Acesso em: 26 ago. 2023.