



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E
BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA**



CAROLINE BARCELOS COSTA ORLANDI

**CARACTERIZAÇÃO DOS BIOFILMES DE DERMATÓFITOS
E DESENVOLVIMENTO DE PROTÓTIPOS ANTI-
DERMATÓFITOS NAS FORMAS PLANCTÔNICA E
BIOFILME**

Araraquara
2016

CAROLINE BARCELOS COSTA ORLANDI

**CARACTERIZAÇÃO DOS BIOFILMES DE DERMATÓFITOS
E DESENVOLVIMENTO DE PROTÓTIPOS ANTI-
DERMATÓFITOS NAS FORMAS PLANCTÔNICA E
BIOFILME**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como um dos pré-requisitos para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria José Soares Mendes Giannini
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Marisa Fusco Almeida
Orientador no exterior: Prof. Dr. Joshua Daniel Nosanchuk

Araraquara
2016

Ficha Catalográfica
Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

C837c Costa Orlandi, Caroline Barcelos
Caracterização dos biofilmes de dermatófitos e desenvolvimento de protótipos anti-dermatófitos nas formas planctônica e biofilme / Caroline Barcelos Costa Orlandi – Araraquara, 2016
233 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

Orientador: Maria José Soares Mendes Giannini
Orientador no exterior: Joshua Daniel Nosanchuk
Coorientador: Ana Marisa Fusco Almeida

1. Dermatófitos. 2. Biofilmes. 2. Ácido protocatecuico. 3. Nanopartículas de óxido nítrico. 4. Eflinaconazol. I. Giannini, Maria José Soares Mendes, orient. II. Nosanchuk, Joshua Daniel, orient. III. Almeida, Ana Marisa Fusco, coorient. IV. Título.

CAPES: 40300005

CAROLINE BARCELOS COSTA ORLANDI

**CARACTERIZAÇÃO DOS BIOFILMES DE DERMATÓFITOS E
DESENVOLVIMENTO DE PROTÓTIPOS ANTI-DERMATÓFITOS NAS
FORMAS PLANCTÔNICA E BIOFILME**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como um dos pré-requisitos para a obtenção do título de Doutor.

Aprovada em 26 / 02 / 2016

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini – Orientadora
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP)

Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda
Universidade de São Paulo (USP)

Dr. Mauro Cintra Giudice
Universidade de São Paulo (USP)

Prof. Dr. Marlus Chorilli
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP)

Profa. Dra. Maria Aparecida de Resende Stoianoff
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

*Aos meus pais Maria e Marcio, merecedores de todas as minhas conquistas e ao meu marido
Cesar pelo amor, apoio e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, pelas oportunidades, desafios, lições, aprendizados, vitórias; por me ensinar a levantar nas derrotas, pela proteção diária e por sempre me orientar para o melhor caminho.

À Prof.^a Dr.^a Maria José Soares Mendes Giannini por me aceitar como orientanda, por me abrir as portas do seu laboratório, pela confiança e oportunidade de crescimento profissional e pessoal, pelos conselhos sensatos, apoio, incentivo e ensinamentos. Levarei sempre comigo a admiração e seu exemplo de mulher forte, profissionalismo, inteligência e ética. Evoluí muito nesses últimos quatro anos e se não fosse o seu apoio fundamental, nada desse trabalho seria possível.

À Prof.^a Dr.^a Ana Marisa Fusco Almeida pela co-orientação, pelo apoio na realização dos projetos, pelas oportunidades concedidas, ajuda, incentivo e presença indispensáveis na realização desse trabalho. Obrigada por tudo!

Aos meus pais Maria e Marcio por nunca terem poupado esforços para a minha educação, por serem exemplos de perseverança, de luta, por me apoiarem em todas as escolhas que fiz, por todo o incentivo ao longo desses anos, pelos bons conselhos e, principalmente, por terem sido sempre os melhores pais que eu poderia ter. Tudo o que sou, tudo o que tenho e o que vier a ser devo a esses dois anjos que Deus me enviou em forma de pais. À minha mãe por sempre ser tão exigente quando o quesito era estudar e por ter me ensinado desde menina a fazer os projetos e a trabalhar com dedicação e amor, com honestidade e sem precisar passar por cima de ninguém.

Ao meu marido, meu amor e melhor amigo Carlos Cesar, por toda a compreensão durante os finais de semana, feriados e meses de ausência durante a realização do doutorado e de parte do doutorado nos Estados Unidos. O seu amor, carinho e apoio nesse período foram fundamentais para a finalização desse trabalho e pelas vitórias que foram conquistadas e os

sonhos que foram realizados com os resultados obtidos. Obrigada pelo seu respeito, incentivo e companheirismo!

À minha irmã Marília pelo incentivo, torcida e ajuda em todos os momentos em que precisei, sejam eles um ombro amigo ou uma correção de inglês. Que essa tese possa auxiliá-la em algum momento na sua profissão.

To Dr. Joshua Nosanchuk for welcoming me in his laboratory, making one of the biggest dreams of my life come true. I am grateful for his valuable suggestions regarding the development of this thesis and also for the opportunity of personal, professional and cultural growth during my stay at Einstein and in New York. I will always bring with me his example of humanity, professionalism and attention. Thanks for the support, the advice, the ideas, and for always being so kind. Dr. Nosanchuk, you will always have my admiration and gratitude.

To Dr. Adam Friedman and Dr. Joel Friedman for the collaboration and opportunity of working with nitric oxide nanoparticles.

To Dr. Luis R. Martinez for the advice, suggestions and collaboration with the confocal microscopy and to Dr. Mahmoud Ghannoum for gently give away an ATCC strain in order to complete part of this work.

To my lab colleagues in the US: Angelo Landriscina, Jamie Rosen, Breanne Mordowski; Anjana Ray, Jorge Aguilar, Ludmila Baltazar and Gabrielle Vargas for all the good moments, the hard moments and learnings. In particular to Angelo and Jamie for all the help with the synthesis of nanoparticles; to Ludmila Baltazar for the clarifications regarding the documentation and for introducing me to Einstein and the laboratory. To Gabriele Vargas for assisting with the interpretation of the transmission microscopy results and the sincere friendship and joy next to Ana Gradíssimo, who both made the difficult moments somehow lighter, fun and enjoyable. Thank you for everything!

To the students and staff of Dr. Arturo Casadevall's laboratory: Johanna Rivera, Antonio Nakouzi-Naranjo, Eric Jung, Carlos Deleon-Rodriguez and Julie Wolf for all the assistance in the fluorescence microscope and for being so solicitous and kind during my time in Einstein . To Dr. Arturo Casadevall for having providing his laboratory and his equipment.

To Rebecca Wilson and Khadija Ismail for sharing their apartment with me and for being the best roommates. Thank you for everything!

À Prof^a. Dr.^a Maria Aparecida de Resende Stoianoff por me despertar a paixão pela Micologia básica e clássica através dos seus ensinamentos com tanta dedicação e por sempre ter confiado em mim e no meu trabalho. Se hoje sou uma Micologista e sei trabalhar com todos os fungos e com sua identificação, agradeço aos seus ensinamentos, às oportunidades que me deu e à confiança que depositou em mim. Agradeço também por ter cedido os isolados clínicos de dermatófitos obtidos durante o meu trabalho de Mestrado para que esse trabalho de Doutorado fosse possível e também pelas sugestões valiosas durante o meu exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos pelas sugestões tão pertinentes e ideias valiosas para que este trabalho possa ser continuado.

Ao Prof. Dr. Luis Octávio Regasini pela colaboração e síntese dos compostos derivados do ácido protocatecuico.

Ao Prof. Rondinelli Herculano pela colaboração e oportunidade de aprendizado.

Aos mestres que passaram pela minha vida, em especial à Prof.^a Norma Lúcia dos Santos Raymundo; a todos os professores e funcionários do Departamento de Microbiologia da UFMG e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP. Obrigada pelos ensinamentos básicos e aplicados e pelas portas abertas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida durante o doutorado no Brasil e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado sanduíche no exterior.

À família Barcelos/França/Costa pela torcida e pelo apoio. Especialmente às minhas tias Vera, Ivone, Ione e aos meus avós Anália, Geraldo e Ambrosina, que sempre se preocuparam e torceram pelo meu sucesso. À minha segunda família Blini/Orlandi, a família que escolhi, por terem me acolhido tão bem em Araraquara e em especial à minha sogra Ana, a qual considero uma segunda mãe, por todo o apoio e carinho.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Micologia/ Núcleo de Proteômica da UNESP: Liliana Scorzoni, Fernanda Sangalli, Haroldo Oliveira, Caroline Marcos, Patrícia Akemi, Julhiany Silva, Ana Carolina Silva, Suéllen Rossi, Rosângela Moraes, Mônica Yonashiro, Wanessa Martins, Regina Pires, Luciana Soares, Junya Singulani, Luana Oliveira, Fernanda Campos, Kaila Alarcón, Jaqueline Derissi, Ana Cerrejón, Cláudia Santos, Paulo Cesar Gomes, Thais Bernardi, Tatiane Benaducci, Danielle Carvalheiro, Janaina Sardi, Fernanda Gullo, Nayla Pitangui, Natália Strohmayr, Warley Xavier, Priscila Lacerda e Mariana Galeane. Obrigada pela convivência, pela ajuda, esclarecimentos, pelas oportunidades de trabalho em conjunto, pelas trocas, aprendizados e lições com os momentos bons e ruins. Aprendi e cresci muito nesse tempo de UNESP e serei eternamente grata a cada um de vocês.

Em especial, agradeço à Regina Pires, Janaina Sardi, Haroldo Oliveira, Patrícia Akemi, Junya Singulani, Cláudia Santos, Liliana Scorzoni, Fernanda Gullo e Natália Strohmayr pela ajuda fundamental, seja ela técnica e/ou intelectual em alguns experimentos do doutorado. À Ana Carolina Silva, Wanessa Martins, Luciana Soares, Liliana Scorzoni e Fernanda Campos pela oportunidade de trabalho em conjunto e pela parceria nos artigos. À Rosângela Moraes e Jaqueline Derissi pela boa vontade e ajuda em todas as vezes em que precisei. À Janaina Sardi pela ajuda e esclarecimentos nos primeiros experimentos com os biofilmes. Ao Haroldo

Oliveira e Patrícia Akemi pela paciência, persistência e ajuda na identificação molecular. À Junya Singulani por sua sinceridade, amizade, honestidade, apoio, disponibilidade; à Luana Oliveira pela alegria mesmo diante das dificuldades e pela oportunidade de ensinar e à Regina por compartilhar o seu conhecimento, experiência, pelo auxílio fundamental e incentivo na condução final desse trabalho, pela amizade, animação e bons conselhos. Obrigada por toda alegria de cada um de vocês, pela boa vontade e pelas críticas construtivas. Muito obrigada ao Lab. Micologia e, principalmente, aos amigos que fiz pela ajuda, sinceridade, pelas risadas, pelo companheirismo, pelo trabalho e oportunidade de partilhar com alguns um pouco da experiência e do que aprendi ao longo desses anos, além da oportunidade de aprender com cada um em todos os momentos. Que Deus lhes abençoe sempre por tudo e que cada um tenha seu sucesso merecido.

Por fim, agradeço à Sociedade Americana de Microbiologia (*American Society for Microbiology – ASM*) e à Sociedade Americana de Micologia Médica (*Medical Mycology Society of Americas - MMSA*) pelo prêmio *Carlyn Halde Latin American Student Travel Award* e pela oportunidade de apresentar por duas vezes parte desse trabalho no exterior e discutí-lo com alguns dos melhores profissionais do mundo.

“Try not to become a man of success, but rather try to become a man of value”

“Não tente ser bem-sucedido sem antes ser um homem de valor”

(Albert Einstein)

RESUMO

Dermatófitos são fungos que apresentam a capacidade de invadir os tecidos queratinizados do homem e dos animais, produzindo a dermatofitose. Biofilmes são comunidades estruturadas de microrganismos que se agrupam de maneira organizada a uma superfície ou que se aderem uns aos outros, dentro de uma matriz extracelular que eles mesmos produzem. Pela primeira vez, neste trabalho, foi descrita a formação de biofilmes por isolados clínicos e cepas ATCC de dermatófitos. Também se avaliou a sensibilidade das cepas frente aos antifúngicos convencionais e derivados sintéticos do ácido protocatecuico, determinando sua toxicidade e eficiência, tanto nas formas planctônicas como de biofilme. A identificação molecular dos isolados clínicos mostrou concordância com a identificação convencional. Todas as cepas e isolados foram capazes de formar biofilmes nos quatro meios testados. *Trichophyton. rubrum* ATCC 28189, ATCC MYA-4438, *T. rubrum* 143 e *Trichophyton. mentagrophytes* 66 produziram mais biomassa e matriz extracelular que *T. mentagrophytes* ATCC 11481 ($p < 0.05$). RPMI 1640, BHI e DMEM estimularam maior produção de biomassa e matriz extracelular que o meio de queratinócitos. Todas as espécies foram capazes de formar biofilmes maduros em 72 h e uma rede de hifas circundadas em vários pontos por uma matriz extracelular foi mostrada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Na microscopia confocal, aparentemente os meios RPMI e DMEM produziram biofilmes mais espessos e o meio BHI, biofilmes mais densos e compactos. As melhores atividades anti-dermatófitos foram expressas pelos protocatecuatos de butila, pentila, hexila, nonila e decila, que exibiram baixa toxicidade para as células HaCat, NHOK e HepG2 nas regiões da concentração inibitória mínima (CIM). Nonila foi o composto com melhor índice de seletividade para as células HaCat e HepG2; para as células NHOK os compostos mais seletivos foram hexila e nonila. Fluconazol, griseofulvina, terbinafina e nonila inibiram o crescimento das células planctônicas para todas as cepas. No entanto, os biofilmes pré-formados foram resistentes a todos os fármacos, com exceção do composto nonila. As células em formato biofilme foram mais resistentes aos antifúngicos que as células planctônicas. A maioria dos biofilmes tratados teve redução da espessura quando comparada ao não tratado. Nenhum biofilme tratado apresentou 100% de morte celular. Na sequência deste estudo, foi verificado o potencial antifúngico *in vitro* de nanopartículas de óxido nítrico (NO-np) e de efinaconazol a 10% (Jublia[®]) contra as formas planctônicas e biofilmes de *T. rubrum* (cepa MYA-4438 ATCC e um isolado clínico). As NO-np foram capazes de inibir *in vitro*, o crescimento de *T. rubrum*. O efinaconazol foi o fármaco que melhor inibiu o crescimento de *T. rubrum*, seguido pela terbinafina e o fluconazol. As combinações, entre as NO-np, o efinaconazol e a terbinafina produziram interações sinérgicas. A combinação entre as NO-np e o efinaconazol teve um comportamento fungistático na cepa ATCC de *T. rubrum*. As NO-np não apresentaram toxicidade para as células HaCat. Todos os fármacos testados foram capazes de inibir o crescimento das células planctônicas de *T. rubrum*; já as NO-np não foram capazes de inibir o crescimento e reduzir a atividade metabólica. Os biofilmes pré-formados foram resistentes a todos os fármacos testados, porém, o biofilme formado pelo isolado clínico de *T. rubrum* foram sensíveis às NO-np na concentração de 40 mg/mL. Já os biofilmes da cepa ATCC foram resistentes à mesma concentração de nanopartículas. A grande maioria dos resultados da MEV dos biofilmes tratados foi concordante aos resultados mostrados pelo ensaio de redução do XTT. Os tratamentos com o efinaconazol e as NO-np causaram diminuição das espessuras dos biofilmes formados pelo isolado clínico e pela cepa ATCC. Esses resultados representam um avanço para a pesquisa no campo dos dermatófitos e de biofilmes e podem contribuir de maneira significativa para a pesquisa de novos fármacos para o tratamento dessas micoses.

Palavras-chave: Dermatófitos; biofilmes; ácido protocatecuico; nanopartículas de óxido nítrico; efinaconazol

ABSTRACT

Dermatophytes are fungi that have the ability to invade keratinized tissues of human and animals, producing a condition called dermatophytosis. Biofilms are structured microbial communities that are organized by adhering to a surface, as well as to each other via an extracellular polymeric matrix. For the first time, in this work, the biofilm formation by ATCC strains and clinical isolates of dermatophytes was described. Also, the susceptibilities of the strains to conventional antifungal drugs and to the synthetic derivatives of protocatechuic acid were evaluated, determining its toxicity and efficacy. The molecular identification corroborated with the conventional one. All strains were able to form biofilms in the four media tested. *Trichophyton. rubrum* ATCC 28189, *Trichophyton. mentagrophytes* 66, and *T. rubrum* 143 produced more biomass, polysaccharide structures and extracellular matrix than *T. mentagrophytes* ATCC 11481 ($p < 0.05$). RPMI 1640, BHI and DMEM stimulated increased production of biomass and extracellular matrix when compared to the medium for keratinocytes. All species were able to form mature biofilms in 72 hours. The SEM results showed a coordinated network of hyphae in all directions, surrounded by an extracellular matrix. In confocal microscopy, apparently RPMI and DMEM media produced thicker biofilms, while the BHI produced denser and compact biofilms. The greatest anti-dermatophytes activities were expressed by butyl, pentyl, hexyl, nonyl and decyl, protocatechuates, which exhibit low toxicity to HaCat, HepG2 and NHOK cells in the regions of minimal inhibitory concentrations (MIC). Nonyl was the compound with improved selectivity index for HaCat and HepG2 cells; for NHOK cells, the most selective compounds were nonyl and hexyl. Fluconazole, griseofulvin, terbinafine and nonyl inhibited the growth of planktonic cells for all strains. However, the pre-formed biofilms were resistant to all antifungal drugs tested except to the nonyl compound. The cells in biofilm form were more resistant to antifungal drugs than planktonic cells. Most of treated biofilms had reduced thickness when compared to the untreated biofilms. In the sequence of this study, the *in vitro* antifungal activity of nitric oxide nanoparticles (NO-np) and efinaconazole 10% (Jublia[®]) was checked against planktonic and biofilm forms of *T. rubrum* (strain ATCC MYA-4438 and one clinical isolate). The NO-np was able to inhibit the *in vitro*'s growth of *T. rubrum*. Efinaconazole was the best drug able to inhibit the growth of *T. rubrum*, followed by terbinafine and fluconazole. The combinations between NO-np, efinaconazole and terbinafine, produced synergistic interactions. The combination between NO-np and efinaconazole was fungistatic against the ATCC strain of *T. rubrum*. The NO-np showed no toxicity to HaCat cells. Both clinical isolate and the ATCC strain ATCC MYA-4438 were able to form biofilms and 72 hours was the ideal time for biofilm maturation. The biofilms formed by ATCC strain produced more biomass than the clinical isolate. All the antifungal drugs tested were able to inhibit the growth of planktonic cells of *T. rubrum*; the NO-np concentrations in which the reading on the spectrophotometer was possible, were not able to inhibit growth and to reduce the metabolic activity. The pre-formed biofilms were resistant to all tested drugs; however, the biofilms formed by the clinical isolate were susceptible to NO-np in a concentration of 40 mg/ml. The biofilms formed by the ATCC strain were resistant to the same concentration of nanoparticles. The vast majority of the SEM results of the treated biofilms were consistent with the results shown by the XTT reduction assay. Treatments with efinaconazole and NO-np reduced the thickness of the biofilms formed by the clinical isolate and by ATCC MYA-4438 strain. These results represent an advance for the research in biofilms field and can contribute significantly to the research of new drugs for the treatment of dermatophytosis.

Keywords: Dermatophytes; biofilms; protocatechuic acid; nitric oxide nanoparticles; efinaconazole.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da terbinafina	41
Figura 2. Estrutura química do efinaconazol.....	43
Figura 3. Modelo de formação de biofilmes em fungos filamentosos	46
Figura 4. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) das nanopartículas de óxido nítrico (NO-np)	50
Figura 5. Estrutura molecular do ácido protocatecuico e seus ésteres.	60
Figura 6. Citotoxicidade dos compostos derivados do ácido protocatecuico em linhagens celulares HaCat (queratinócitos normais de pele humana).	85
Figura 7. Citotoxicidade dos compostos derivados do ácido protocatecuico em linhagens celulares NHOK (queratinócitos normais de mucosa oral humana)	86
Figura 8. Citotoxicidade dos compostos derivados do ácido protocatecuico em linhagens celulares HepG2 (células de hepatocarcinoma humano).....	87
Figura 9. Análise morfológica dos biofilmes de <i>T. mentagrophytes</i> ATCC 11481 e <i>T. rubrum</i> ATCC 28189 no equipamento <i>In Cell Analyser</i> (GE Healthcare).....	90
Figura 10. Comparação entre as atividades metabólicas dos biofilmes maduros formados em meio RPMI 1640, de cepas clínicas e ATCC de <i>T. rubrum</i> e <i>T. mentagrophytes</i>	91
Figura 11. Cinética da formação de biofilme em <i>T. rubrum</i> e <i>T. mentagrophytes</i> em microplacas de 96 poços.....	92
Figura 12. Quantificação da biomassa pela coloração com cristal violeta.....	94
Figura 13. Influência de RPMI, BHI, DMEM e meio de queratinócitos na produção de biomassa nos biofilmes de <i>T. rubrum</i> e <i>T. mentagrophytes</i>	96
Figura 14. Quantificação da matriz extracelular e estruturas polissacarídicas pela coloração com safranina.....	97
Figura 15. Influência de RPMI, BHI, DMEM e meio de queratinócitos na produção de matriz extracelular e estruturas polissacarídicas nos biofilmes de <i>T. rubrum</i> e <i>T. mentagrophytes</i> . ..	99
Figura 16. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro de <i>T. rubrum</i> ATCC 28189 formado em meio RPMI.....	101
Figura 17. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro de <i>T. rubrum</i> ATCC 28189 formado em meio BHI.....	102

Figura 18. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro de <i>T. rubrum</i> ATCC 28189 formado em DMEM com soro fetal bovino	103
Figura 19. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro de <i>T. rubrum</i> 143 formado em meio RPMI	104
Figura 20. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro de <i>T. rubrum</i> 143 formado em meio BHI	105
Figura 21. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro de <i>T. rubrum</i> 143 formado em meio DMEM com soro fetal bovino	106
Figura 22. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro de <i>T. mentagrophytes</i> ATCC 11481 formado em meio RPMI.	107
Figura 23. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro de <i>T. mentagrophytes</i> ATCC 11481 formado em meio BHI	108
Figura 24. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro de <i>T. mentagrophytes</i> ATCC 11481 formado em meio DMEM.....	109
Figura 25. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro de <i>T. mentagrophytes</i> 66 formado em meio RPMI.	110
Figura 26. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro de <i>T. mentagrophytes</i> 66 formado em meio BHI.....	111
Figura 27. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro de <i>T. mentagrophytes</i> 66 formado em meio DMEM.	112
Figura 28. Microscopia confocal dos biofilmes maduros de <i>T. mentagrophytes</i> ATCC 11481 e <i>T. rubrum</i> ATCC 28189	116
Figura 29. Microscopia Confocal de Varredura a Laser dos biofilmes maduros de <i>T. mentagrophytes</i> ATCC 11481 (A) e <i>T. rubrum</i> ATCC 28189 (B)	117
Figura 30. Microscopia confocal dos biofilmes maduros de <i>T. rubrum</i> ATCC 28189 (A, B e C), <i>T. rubrum</i> 143 (D, E e F), <i>T. mentagrophytes</i> ATCC 11481 (G, H e I) e <i>T. mentagrophytes</i> 66 (J, K e L), formados em meio RPMI, BHI e DMEM, respectivamente.	118
Figura 31. Efeito do fluconazol nas células planctônicas de <i>Trichophyton</i> spp. determinado pelo teste de redução da atividade metabólica (XTT)	120
Figura 32. Efeito da griseofulvina nas células planctônicas de <i>Trichophyton</i> spp., determinado pelo teste de redução da atividade metabólica (XTT)..	121
Figura 33. Efeito da terbinafina na prevenção da formação de biofilmes de <i>Trichophyton</i> spp. determinado pelo teste de redução da atividade metabólica (XTT).	122

Figura 34. Efeito do protocatecuato de nonila nas células planctônicas de <i>Trichophyton</i> spp. determinado pelo teste de redução da atividade metabólica (XTT).	123
Figura 35. Sensibilidade dos biofilmes maduros de <i>T. rubrum</i> e <i>T. mentagrophytes</i> expostos ao fluconazol.	125
Figura 36. Sensibilidade dos biofilmes maduros de <i>T. rubrum</i> e <i>T. mentagrophytes</i> frente à griseofulvina.	126
Figura 37. Sensibilidade dos biofilmes maduros de <i>T. rubrum</i> e <i>T. mentagrophytes</i> frente à terbinafina.	127
Figura 38. Sensibilidade dos biofilmes maduros de <i>T. rubrum</i> e <i>T. mentagrophytes</i> frente ao protocatecuato nonila.....	128
Figura 39. Comparação entre as células planctônicas e em formato biofilme de <i>Trichophyton</i> sp., tratados com fluconazol	131
Figura 40. Comparação entre as células planctônicas e em formato biofilme de <i>Trichophyton</i> sp., tratados com griseofulvina.	132
Figura 41. Comparação entre as células planctônicas e em formato biofilme de <i>Trichophyton</i> sp., tratados com terbinafina.....	133
Figura 42. Comparação entre as células planctônicas e em formato biofilme de <i>Trichophyton</i> sp., tratados com nonila.....	134
Figura 43. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme de <i>T. rubrum</i> ATCC 28189 tratado com fluconazol (A, B, C e D) e griseofulvina (E, F, G e H)	137
Figura 44. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme de <i>T. rubrum</i> ATCC 28189 tratado com terbinafina (A, B, C e D) e nonila (E, F, G e H).....	138
Figura 45. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme de <i>T. rubrum</i> 143 tratado com fluconazol (A, B, C e D) e griseofulvina (E, F, G e H).	139
Figura 46. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme de <i>T. rubrum</i> 143 tratado com terbinafina (A, B, C e D) e nonila (E, F, G e H).....	140
Figura 47. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme de <i>T. mentagrophytes</i> ATCC 11481 tratado com fluconazol (A, B, C e D) e griseofulvina (E, F, G e H)	143
Figura 48. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme de <i>T. mentagrophytes</i> ATCC 11481 tratado com terbinafina (A, B, C e D) e nonila (E, F, G e H).....	144
Figura 49. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme de <i>T. mentagrophytes</i> 66 tratado com fluconazol (A, B, C e D) e griseofulvina (E, F, G e H).	145
Figura 50. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme de <i>T. mentagrophytes</i> 66 tratado com terbinafina (A, B, C e D) e nonila (E, F, G e H).....	146

Figura 51. Cortes ortogonais em 3D, indicando a espessura dos biofilmes de <i>T. mentagrophytes</i> com e sem tratamento.....	148
Figura 52. Cortes ortogonais em 3D, indicando a espessura dos biofilmes de <i>T. rubrum</i> com e sem tratamento.....	149
Figura 53. Microscopia confocal dos biofilmes tratados em diferentes magnificações.....	150
Figura 54. Microscopia eletrônica de transmissão das células planctônicas de <i>T. rubrum</i> tratadas com No-np, Jublia® (Efinaconazol) e com a combinação entre No-np X Jublia® (Efinaconazol)	182
Figura 55. Citotoxicidade das NO-np em linhagens celulares HaCat (queratinócitos de pele humana)	183
Figura 56. Análise morfológica dos biofilmes de <i>T. rubrum</i> , por microscopia óptica, no microscópio invertido Axiovert 200 M (<i>Carl Zeiss MicroImaging</i>).....	185
Figura 57. Cinética de formação do biofilme de <i>T. rubrum</i> pelo ensaio de redução do XTT.	186
Figura 58. Quantificação da massa dos biofilmes maduros de <i>T. rubrum</i> através da coloração por cristal violeta.	187
Figura 59. Efeito do fluconazol, terbinafina, efinaconazol e nanopartículas de óxido nítrico nas células planctônicas de <i>T. rubrum</i> , determinado pelo teste de redução do XTT.....	190
Figura 60. Efeito do fluconazol, terbinafina, efinaconazol e nanopartículas de óxido nítrico nos biofilmes pré-formados de <i>T. rubrum</i> , determinado pelo teste de redução do XTT.	193
Figura 61. Microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes maduros de <i>T. rubrum</i> ATCC MYA-4438 (a, b e c) e do isolado clínico (d, e e f), sem tratamento, formados em meio RPMI 1640	196
Figura 62. Microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes maduros de <i>T. rubrum</i> ATCC MYA-4438 (a, b e c) e do isolado clínico (d, e e f), tratados com fluconazol, na concentração de 512 mg/L, formados em meio RPMI 1640.	197
Figura 63. Microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes maduros de <i>T. rubrum</i> ATCC MYA-4438 (a, b e c) e do isolado clínico (d, e e f), tratados com terbinafina, na concentração de 32 mg/L.....	198
Figura 64. Microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes maduros de <i>T. rubrum</i> ATCC MYA-4438 (a, b e c) e do isolado clínico (d, e e f), tratados com efinaconazol, na concentração de 320 mg/L.....	199
Figura 65. Microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes maduros de <i>T. rubrum</i> ATCC MYA-4438 (a, b e c) e do isolado clínico (d, e e f), tratados com NO-np, na concentração de 40 mg/mL.	200

Figura 66. Cortes ortogonais em 3D, indicando a espessura dos biofilmes de *T. rubrum* com e sem tratamento. A, B e C representam os biofilmes de *T. rubrum* ATCC MYA-4438 sem tratamento; tratados com NO-np e com efinaconazol, com espessuras de 24, 7 e 7 μm , respectivamente. D, E e F representam os biofilmes do isolado clínico não tratados (27 μm); tratados com NO-np (9 μm) e tratados com o efinaconazol (9 μm).....203

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Confirmação da identificação fenotípica dos isolados clínicos através do sequenciamento da região ITS.....	76
Tabela 2. Valores da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM), expressos em mg/L para o ácido protocatecuico e seus derivados e fármacos antifúngicos contra espécies de <i>T. rubrum</i>	80
Tabela 3. Valores de CIM e CFM, expressos em mg/L para o ácido protocatecuico e seus derivados e fármacos contra espécies de <i>T. mentagrophytes</i> , <i>M. gypseum</i> , <i>M. canis</i> , <i>C. parapsilosis</i> e <i>C. krusei</i>	81
Tabela 4. Representação do IC ₅₀ e IS em células HaCat, NHOK e HeG2 dos compostos butila, pentila, hexila, nonila e decila.	89
Tabela 5. Interação entre terbinafina e o protocatecuato de nonila contra <i>T. rubrum</i> e <i>T. mentagrophytes</i>	153
Tabela 6. Valores de CIM e CFM para as nanopartículas e fármacos contra espécies de <i>T. rubrum</i>	173
Tabela 7. Combinação entre nanopartículas de óxido nítrico X efinaconazol (Jublia®).....	176
Tabela 8. Combinação entre nanopartículas de óxido nítrico X terbinafina	178
Tabela 9. Valores de MIC e MFC da combinação entre NO-np X Jublia® (Efinaconazol)..	179

LISTA DE ABREVIATURAS

- ATCC – *American Type Culture Collection*
- BHI – *Brain Heart Infusion*
- BLASTn - *Basic Local Alignment Search Tool*
- CFM – Concentração fungicida mínima
- CIF - Concentração inibitória fracionada
- CIM – Concentração inibitória mínima
- CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- CN – Controle negativo
- CO₂. – Gás carbônico
- ConA/CAAF - Concanavalina A
- CP – Controle positivo
- CTAB - Brometo de cetiltrimetilamônio
- DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's médium*
- DTH – Hipersensibilidade do tipo tardia
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- dNTP's - Desoxirribonucleotídeos fosfatados
- DO – Densidade óptica
- EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- ELISA – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
- eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial
- FDA - *Food and Drug Administration*
- h – Hora

HaCat - Queratinócitos de pele humana

HCl – Ácido clorídrico

HepG2 - Células de hepatoma humano

hrs – Horas

IC₅₀ - Concentração onde ocorre 50% de morte celular

ICIF – Índice de concentração inibitória fracionada

ID – Identidade

iNOS – Óxido nítrico sintase induzida

IS - Índice de seletividade

ITS – *Internal Transcribed spacer*

L- Litro

Mc – *Microsporium canis*

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

Mg – *M. gypseum*

mg – Miligramas

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

mL - Mililitros

mM – Milimolar

MOPS - Ácido 3-(N-morfolina) propanossulfônico

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

mtDNA – DNA mitocondrial

MTT – (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)

NaCl – Cloreto de sódio

NaOAc - Acetato de sódio

NHOK - Queratinócitos normais de mucosa oral humana

nm – Nanômetros

NO – Óxido nítrico

NO₃⁻ - Nitrito

NO-np – Nanopartícula de óxido nítrico

NP – Nanopartícula

NTS – *Nontranscribed spacer*

°C – Graus Celsius

PBS – *Phosphate buffered saline*

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pH – Potencial de hidrogênio

RAPD - *Randomly amplified polymorphic DNA*

rDNA – DNA ribossomal

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RNA - Ácido ribonucleico

RNOS - Espécies reativas de óxido de nitrogênio

ROS – Espécies reativas de oxigênio

rpm – Rotações por minuto

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*

rRNA – RNA ribossomal

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SSU 1 – Gene codificante da bomba de efluxo de sulfito

TAE - Tris-Acetato-EDTA

Tm – *T. mentagrophytes*

TMOS – Tetrametilortosilano

Tr – *Trichophyton rubrum*

TRS – Elementos repetitivos interespersados

UFC – Unidades formadoras de colônia

UV – Ultravioleta

VERO – Células de rim de macaco verde da África

XTT - (2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[carbonilo(fenilamino)]-2H-tetrazólio-hidróxido)

µg – Microgramas

µL – Microlitros

SUMÁRIO

<i>Capítulo I</i>	27
1. INTRODUÇÃO	29
1.1. REVISÃO HISTÓRICA	29
1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	32
1.2.1. Dermatofitoses	32
1.2.2. Patogenia e fatores de virulência.....	33
1.2.3. Epidemiologia	35
1.2.4. Diagnóstico.....	36
1.2.4.1. Método convencional	37
1.2.4.2. Método molecular.....	38
1.2.5. Tratamento	39
1.2.6. Biofilmes	43
1.2.7. Ácido protocatecuico.....	46
1.2.8. Nanopartículas de óxido nítrico (NO-np).....	47
<i>Parte I: Caracterização dos biofilmes de dermatófitos e desenvolvimento de protótipos anti-dermatófitos nas formas planctônica e biofilme a partir de derivados sintéticos do ácido protocatecuico.</i>	52
2. OBJETIVOS	54
2.1. OBJETIVO GERAL.....	54
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
3. MATERIAL E MÉTODOS	56
3.1. AMOSTRAGEM.....	56
3.2. CULTIVO DOS DERMATÓFITOS	56
3.3. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	56
3.3.1. Extração e purificação do DNA	57
3.3.2. Amplificação da região ITS pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	58
3.3.3. Sequenciamento e análise dos produtos da PCR.....	58
3.4. OBTENÇÃO DOS FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS E DOS COMPOSTOS DERIVADOS DO ÁCIDO PROTOCATECUICO.....	59
3.5. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE DERMATÓFITOS AOS ANTIFÚNGICOS E COMPOSTOS SINTÉTICOS PELA TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO.....	60
3.5.1. Diluição dos fármacos.....	60
3.5.2. Diluição dos compostos derivados do ácido protocatecuico.....	61

3.5.3. Preparo do inóculo	61
3.5.4. Controle de qualidade.....	62
3.5.5. Análise morfológica da sensibilidade dos isolados clínicos e cepas ATCC frente aos derivados do ácido protocatecuico	62
3.6. CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM).....	62
3.7. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO DA SULFORODAMINA B	63
3.7.1. Cultura de células	63
3.7.2. Montagem das placas	63
3.7.3. Método colorimétrico da sulforodamina B	64
3.8. ENSAIO DE FORMAÇÃO DO BIOFILME <i>in vitro</i>	65
3.8.1. Análise morfológica do biofilme.....	65
3.8.2. Determinação da atividade metabólica do biofilme pelo ensaio de redução de XTT	66
3.8.3. Quantificação do biofilme	66
3.8.3.1. Quantificação da massa biofilme por coloração com cristal violeta	66
3.8.3.2. Quantificação da matriz extracelular pela coloração com safranina.	67
3.8.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	67
3.8.5. Microscopia confocal de varredura a laser.....	68
3.8.6. Efeito dos fármacos antifúngicos e dos derivados do ácido protocatecuico nas células planctônicas	68
3.8.7. Efeito dos fármacos antifúngicos e dos derivados do ácido protocatecuico frente aos biofilmes pré-formados	69
3.8.8. Comparação entre células planctônicas e em formato biofilme quanto à sensibilidade aos fármacos antifúngicos e compostos sintéticos.	70
3.8.9. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biofilmes tratados	70
3.8.10. Microscopia confocal de varredura a laser dos biofilmes maduros tratados com os fármacos e o composto derivado do ácido protocatecuico com melhor índice de seletividade.....	71
3.9. ATIVIDADE <i>in vitro</i> DA COMBINAÇÃO ENTRE TERBINAFINA E O PROTOCATECUATO DE NONILA CONTRA <i>T. rubrum</i> e <i>T. mentagrophytes</i>	71
3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	72
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4.1 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	74
4.2. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DOS DERMATÓFITOS AOS ANTIFÚNGICOS E DERIVADOS DO ÁCIDO PROTOCATECUICO PELA TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)	77

4.3. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO DA SULFORODAMINA B	84
4.4. ENSAIO DE FORMAÇÃO DO BIOFILME	90
4.4.1. Análise morfológica dos biofilmes	90
4.4.2. Determinação da atividade metabólica do biofilme pelo ensaio de redução do XTT	91
4.4.3. Quantificação do biofilme	94
4.4.3.1. Quantificação da massa do biofilme por coloração com cristal violeta	94
4.4.3.2. Quantificação da matriz extracelular e estruturas polissacarídicas pela coloração com safranina.	97
4.4.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	100
4.4.5. Microscopia confocal de varredura a laser.....	113
4.4.6. Efeito dos fármacos antifúngicos e dos derivados do ácido protocatecuico nas células planctônicas	119
4.4.7. Efeito dos fármacos antifúngicos e do derivado do ácido protocatecuico frente aos biofilmes pré-formados de dermatófitos	124
4.4.8. Comparação entre as células planctônicas e em formato biofilme quanto à sensibilidade aos fármacos antifúngicos e ao derivado do ácido protocatecuico	129
4.4.9. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biofilmes tratados	135
4.4.10. Microscopia confocal de varredura a laser dos biofilmes pré-formados tratados	147
4.5. ATIVIDADE <i>in vitro</i> DA COMBINAÇÃO ENTRE TERBINAFINA E O PROTOCATECUATO DE NONILA CONTRA <i>T. rubrum</i> e <i>T. mentagrophytes</i>	152

Parte II: Avaliação in vitro da atividade antifúngica de nanopartículas de óxido nítrico e do efinaconazol (Jublia®) contra células planctônicas e biofilmes de T. rubrum. 155

5. OBJETIVOS	157
5.1. OBJETIVO GERAL.....	157
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	157
6. MATERIAL E MÉTODOS	159
6.1. AMOSTRAGEM.....	159
6.2. CULTIVO.....	159
6.3. OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO NÍTRICO (NO- <i>np</i>)	159
6.4. AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE <i>T. rubrum</i> AOS ANTIFÚNGICOS E ÀS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO NÍTRICO PELA TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO.....	160
6.4.1. Diluição dos fármacos	160

6.4.2. Diluição das nanopartículas	160
6.4.3. Preparo do inóculo	161
6.4.4. Montagem das placas	161
6.4.5. Controle de qualidade.....	161
6.5. CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM).....	162
6.6. COMBINAÇÃO <i>in vitro</i> ENTRE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO NÍTRICO X JUBLIA® E NO-np X TERBINAFINA CONTRA <i>T. rubrum</i>	162
6.7. CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM) DA COMBINAÇÃO ENTRE NO-np E EFINACONAZOL.....	163
6.8. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	164
6.9. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO NÍTRICO EM CÉLULAS DE EPITÉLIO ATRAVÉS DO MÉTODO COLORIMÉTRICO DA SULFORODAMINA B.....	165
6.10. ENSAIO DE FORMAÇÃO DO BIOFILME <i>in vitro</i>	166
6.10.1. Análise morfológica do biofilme.....	166
6.10.2. Determinação da atividade metabólica dos biofilmes pelo ensaio de redução de XTT	166
6.10.3. Quantificação da massa do biofilme por coloração com cristal violeta.....	167
6.10.4. Efeito da terbinafina, fluconazol, efinaconazol e das nanopartículas de óxido nítrico nas células planctônicas de <i>T. rubrum</i>	167
6.10.5. Efeito dos antifúngicos e das nanopartículas de óxido nítrico frente aos biofilmes pré-formados	168
6.10.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	169
6.10.7. Microscopia confocal de varredura a laser.....	169
6.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	170
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	172
7.1. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE <i>T. rubrum</i> AOS ANTIFÚNGICOS E ÀS NANOPARTÍCULAS PELA TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)	172
7.2. COMBINAÇÃO <i>in vitro</i> ENTRE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO NÍTRICO X JUBLIA®	176
7.3. COMBINAÇÃO <i>in vitro</i> ENTRE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO NÍTRICO X TERBINAFINA	177
7.4. CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM) DA COMBINAÇÃO ENTRE NO-np E EFINACONAZOL.....	178
7.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	179
7.6. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO NÍTRICO EM CÉLULAS DE EPITÉLIO ATRAVÉS DO MÉTODO COLORIMÉTRICO DA SULFORODAMINA B.....	183

7.7. ENSAIO DE FORMAÇÃO DO BIOFILME <i>in vitro</i>	184
7.7.1. Análise morfológica dos biofilmes	184
7.7.2. Determinação da atividade metabólica dos biofilmes pelo ensaio de redução de XTT	186
7.7.3. Quantificação da massa do biofilme por coloração com cristal violeta.....	187
7.7.4. Efeito da terbinafina, fluconazol, efinaconazol e das nanopartículas de óxido nítrico nas células planctônicas de <i>T. rubrum</i>	188
7.7.5. Efeito dos antifúngicos e das nanopartículas de óxido nítrico frente aos biofilmes pré-formados de <i>T. rubrum</i>	191
7.7.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	194
7.7.7. Microscopia confocal de varredura a laser.....	201
8. CONCLUSÕES	205
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	207
<i>Capítulo II</i>	223
10. ANEXOS	225

Capítulo I

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. REVISÃO HISTÓRICA

Os dermatófitos são um grupo de fungos intimamente relacionados, que possuem a capacidade de invadir os tecidos queratinizados do homem e de outros animais, produzindo infecção (Weitzman & Summerbell, 1995).

Historicamente a micologia médica, especialmente a relacionada à doença humana, se iniciou com a descoberta da etiologia fúngica do favus e foi centrada em torno de três médicos europeus nos meados do século 19: Robert Remak, Johann L. Schönlein e David Gruby (Weitzman & Summerbell, 1995).

Embora os dermatófitos tenham existido desde tempos pré-históricos e infectado animais durante milhões de anos, estas infecções persistiram bem antes que a sua verdadeira natureza fosse descoberta. A primeira referência a uma infecção dermatofítica foi atribuída a Aulus Cornélio Celsus, um enciclopedista romano, que em seu "De Re Medicina" escrito em torno de 30 dC, descreveu uma infecção com lesões supurativas do couro cabeludo que, posteriormente, veio a ser conhecida como o quérion de Celsus (Ajello, 1974).

Da Idade Média até esta época, as várias dermatofitoses foram descritas como tineia. O termo foi utilizado pela primeira vez para traças ou mariposas de roupas e, na realidade, o nome genérico das diferentes espécies de traças ou mariposas que destruíam a queratina era "Tinea". Uma vez que os buracos feitos por mariposas em vestuário de lã eram circulares e as lesões dermatofíticas ocorrem em forma de anel em pele lisa, os nossos antepassados anglo-saxões denominaram o termo "em forma de anel" para essas infecções, pelo menos até o século 16. Este termo descreve a forma da lesão, e relaciona-se com o termo romano "Tinea" (Ajello, 1974).

Considerada uma época de descobertas, em 1837, Robert Remak, um médico polonês que lecionava na Faculdade de Medicina da Universidade de Berlim, observou hifas nas crostas da doença conhecida como “favus”, porém nunca publicou suas observações, mas permitiu que elas fossem citadas na tese de doutorado de Xavier Hube, em 1937 (Ajello, 1974). Remak alegou não ter reconhecido as estruturas observadas como fungos e creditou o reconhecimento a Schönlein, que descreveu a natureza micótica do favus em 1839. Remak então estabeleceu que a natureza do favus era infecciosa e cultivou o microrganismo em fatias de maçã, denominando-o em seguida como *Achorion schoenleinii* em homenagem a Schönlein. Pela primeira vez um microrganismo foi associado como causa de doença humana (Ajello, 1974). Em 1841, a descoberta de Remak foi confirmada por David Gruby, um médico húngaro que atuava em Paris, e que sucintamente e com cautela, passou a descrever vários tipos diferentes de infecções dermatofíticas: tinea favosa, os parasitismos ectotrix e endotrix na tricofitose e a microsporiose. Gruby também descobriu e nomeou o gênero *Microsporum* em 1843 e descreveu o *Microsporum audouinii* com base no aparecimento do fungo em materiais clínicos. O gênero *Microsporum* é um dos três gêneros de fungos imperfeitos nos quais os dermatófitos são classificados atualmente (Ajello, 1974; Weitzman & Summerbell, 1995).

O segundo gênero, *Trichophyton*, foi descrito em 1845 por Per Hendrik Malmsten, um investigador sueco e o terceiro e último gênero, *Epidermophyton*, foi estabelecido por Raymond Sabouraud em 1910. No entanto, até que os vários dermatófitos fossem isolados e cultivados em cultura pura, os gêneros e espécies desses fungos queratinofílicos não poderiam ser caracterizados e definidos baseados nos princípios e critérios taxonômicos (Ajello, 1974).

Culturas puras dos dermatófitos foram obtidas autonomamente pela primeira vez por volta do ano 1886 por Grawitz, na Alemanha e por Ductaux, na França. Apesar desta conquista e do uso rotineiro subsequente das culturas puras no estudo das suas características macro e microscópicas, a classificação dos dermatófitos permaneceu em um longo estado insatisfatório.

Muitos gêneros e espécies foram descritos baseados nas características triviais e altamente variáveis ou em fatores extrínsecos e irrelevantes, como reações clínicas do hospedeiro e das espécies animais a partir das quais os dermatófitos foram isolados (Ajello, 1974).

Raymond Sabouraud, um dos mais conhecidos e influenciáveis micologistas médicos, iniciou seus estudos científicos com os dermatófitos em 1890. Entre as contribuições de Sabouraud estão os estudos de taxonomia, morfologia, métodos de cultivo e terapia para os dermatófitos. Ele também classificou esses fungos em quatro gêneros: *Achorion*, *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*, baseando-se nos aspectos clínicos da doença e das observações macro e micro morfológicas. O meio de cultura desenvolvido por ele é utilizado atualmente para o cultivo de várias espécies de fungos e foi nomeado em sua homenagem como ágar Sabouraud dextrose (Weitzman & Summerbell, 1995).

Em 1934, Chester Emmons modernizou o esquema de taxonomia de Sabouraud e estabeleceu a atual classificação dos dermatófitos, baseada na morfologia dos esporos e órgãos acessórios, eliminando o gênero *Achorium* e reconhecendo apenas três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* (Weitzman & Summerbell, 1995).

Até o ano 1935, 118 espécies de dermatófitos foram descritas e classificadas em nove gêneros. A morfologia do esporo, características fisiológicas e reprodutivas já substituíram os critérios antigos e subjetivos de classificação e levaram ao que hoje pode ser considerado como uma sólida e mais objetiva classificação taxonômica dos dermatófitos (Ajello, 1974).

1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1. Dermatofitoses

Os dermatófitos são fungos filamentosos queratinofílicos que produzem uma enfermidade denominada dermatofitose, ou mais comumente, “tinha” ou “tinea”. A terminologia médica utilizada para infecções por dermatófitos é determinada pela palavra tinha seguida por uma palavra que descreva o local da infecção, como “tinea pedis”, referindo-se ao local dos pés (Weitzman & Summerbell, 1995; Achterman & White, 2012).

Os fungos dermatófitos possuem três gêneros anamórficos: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* e, apesar da distância taxonômica, têm em comum algumas características microscópicas e a propriedade de colonizar, co-habitar e infectar estruturas queratinizadas como a camada córnea da epiderme, pelos e unhas dos hospedeiros (Weitzman & Summerbell, 1995; Moraes *et al.*, 2001; Achterman & White, 2012; Baldo *et al.*, 2012).

Esses fungos pertencem a um grupo de fungos taxonomicamente relacionados, com um total aproximado de 40 espécies. Dependendo da fonte da queratina utilizada, eles podem ser divididos em geofílicos (solo), zoofílicos (animais) e antropofílicos (humanos). Muitos podem estar presentes na forma anamórfica (estado assexuado: gêneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*) ou estado imperfeito e teleomórfico ou perfeito (reprodução sexuada: maioria das espécies geofílicas e zoofílicas de *Microsporum* e *Trichophyton*). A maioria dos dermatófitos pertence ao filo Ascomycota, classe Euascomycetes, ordem Onygenales e família Arthrodermataceae (Molina De Diego, 2011).

Os dermatófitos geofílicos estão associados principalmente a materiais queratinosos como pelos, penas, cascos e chifres, como parte de seu processo de decomposição. Já os zoofílicos e antropofílicos são adaptados aos animais e aos humanos, sendo assim, são os agentes mais frequentes de micoses superficiais. As espécies antropofílicas são responsáveis pela maioria das infecções nos humanos, contudo, as espécies pertencentes aos três grupos estão

associadas a doenças clínicas. As infecções causadas por espécies antropofílicas em humanos tendem a ser crônicas, com pouca inflamação, enquanto que as infecções causadas pelos dermatófitos geofílicos e zoofílicos estão sempre associadas com inflamação aguda (Saenz, 2001; Aquino, Constante & Bakos, 2007; Macura *et al.*, 2010; Achterman & White, 2012; Baldo *et al.*, 2012).

1.2.2. Patogenia e fatores de virulência

A infecção é geralmente cutânea, restrita à camada córnea, devido à incapacidade do fungo de penetrar em tecidos profundos ou órgãos de indivíduos imunocompetentes. Porém, em indivíduos imunocomprometidos, existem inúmeros relatos de infecções invasivas e profundas (Novick, Tapia & Bottone, 1987; Grossman *et al.*, 1995; Squeo *et al.*, 1998; Nir-Paz *et al.*, 2003; Rodwell *et al.*, 2008; Achterman & White, 2012).

A instalação de um processo patogênico em pele glabra inicia-se sempre pela inoculação de um artroconídio ou fragmento de hifa depositado sobre a pele, favorecido por uma lesão cutânea ou escoriação preexistente, mesmo que mínima (Sidrim & Rocha, 2004). O fungo se adere às células, mediado por adesinas que interagem com receptores do hospedeiro. A penetração no estrato córneo inicia-se com o desenvolvimento de tubos germinativos a partir dos artroconídios. Após sete dias de incubação, as hifas começam a formar artroconídios, completando assim, o ciclo vegetativo de crescimento do fungo. O fungo secreta proteases que degradam a queratina, auxiliando na invasão (Baldo *et al.*, 2012).

Os pelos são atacados secundariamente à evolução de uma lesão na pele que apresenta em sua superfície uma grande quantidade de folículos pilosos. O dermatófito remove a cutícula e tem acesso aos pelos, e só para a sua progressão quando não encontra mais queratina no coleto do bulbo pilar (Weitzman & Summerbell, 1995; Sidrim & Rocha, 2004). Por último, tem-se o

comprometimento das unhas, que ocorre após a penetração do dermatófito no estrato córneo (Bristow, 2004).

Apesar de tudo, os mecanismos de patogenicidade desses fungos ainda não são bem compreendidos. Existem vários estudos com foco nas proteases queratolíticas produzidas pelos dermatófitos, porém ainda não se sabe como esses fungos regulam o uso dessas proteases para obter nutrientes do estrato córneo invadido por eles e quais são os papéis adicionais dessas proteínas na adesão e na imunomodulação (Vermout *et al.*, 2008).

Para o estabelecimento da infecção, o contato do artroconídio ou fragmento de hifa com a pele do hospedeiro é essencial. O fungo expressa adesinas carboidrato específicas na superfície dos microconídios que reconhecem a manose e a galactose. Outras espécies, como *T. mentagrophytes*, desenvolvem projeções fibrilares longas e curtas que ancoram e conectam os artroconídios aos queratinócitos e a outros artroconídios (Martinez-Rossi, Peres & Rossi, 2008), além de proteases como as subtilisinas, dipeptidil peptidases e metaloproteinases, que estão diretamente envolvidas na adesão aos queratinócitos e na invasão ao estrato córneo. Essa adesão é tempo dependente e pode variar dependendo da espécie de dermatófito (Vermout *et al.*, 2008; Baldo *et al.*, 2012). As subtilisinas e fungalisinas são queratinases responsáveis pela digestão da queratina em oligopeptídeos ou aminoácidos assimiláveis. Durante a degradação da queratina, os dermatófitos secretam sulfito (utilizando uma bomba de efluxo de sulfito, codificada pelo gene SSU1). O sulfito é um agente redutor que cliva as pontes dissulfito da queratina em cisteína e S-sulfocisteína, deixando as proteínas capazes de serem digeridas por muitas endo e exoproteases secretadas pelos fungos. A expressão elevada do gene SSU1 é característica dos dermatófitos e auxilia na degradação eficiente dos tecidos queratinizados pelos dermatófitos (Baldo *et al.*, 2012).

A maior atividade queratolítica está diretamente relacionada à produção de infecções mais sintomáticas e à ativação da resposta imune. A infecção dermatofítica induz a

hipersensibilidade do tipo tardia (DTH), que é caracterizada pela ação dos macrófagos como células efectoras e também pela ação de algumas citocinas, como interferon- γ (INF- γ) (Vermout *et al.*, 2008). O padrão de secreção das proteases desempenha um papel importante nas respostas imune e inflamatória (Achterman & White, 2012). A intensidade da inflamação depende da profundidade da lesão na pele e o dano é dependente da maior ou menor secreção de proteases (Vermout *et al.*, 2008).

Um estudo conduzido por Youngchim e colaboradores (2011), relatou a produção de melanina por várias espécies de dermatófitos. Sabe-se que a melanina é considerada um fator de virulência em várias espécies de fungos, uma vez que protege os microrganismos dos mecanismos de defesa do hospedeiro e do meio ambiente. Contudo, ainda não há evidências suficientes para sugerir que a melanina exerça um papel crucial na patogênese desses fungos (Youngchim *et al.*, 2011).

1.2.3. Epidemiologia

A prevalência dos dermatófitos é variável nas diversas regiões do mundo e dentro de um mesmo país, devido a fatores como clima, condições socioeconômicas e higiênicas da população, urbanização, sistema imunológico do hospedeiro, características fúngicas e ações terapêuticas (Ngwogu & Otokunefor, 2007; Neji *et al.*, 2009). As dermatofitoses possuem elevada prevalência na América Latina e atingem tanto o homem quanto os animais domésticos (Pinheiro, Moreira & Sidrim, 1997). *T. rubrum* é considerada a espécie mais prevalente mundialmente e é o agente mais frequentemente isolado nas onicomicoses, tinea pedis, tinea cruris e tinea corporis (Costa-Orlandi *et al.*, 2012; Rivera, Losada & Nierman, 2012).

Embora os dermatófitos sejam prevalentes em todo o mundo, os sítios de infecção variam dependendo da região. Países em desenvolvimento tendem a ter altas taxas de tinea capitis, enquanto países desenvolvidos tendem a apresentar altas taxas de tinea pedis e

onicomicoses. Essas últimas têm sido associadas ao aumento da urbanização, utilização de banheiros comunitários, prática de atividades esportivas, uso de sapatos fechados, entre outros (Achterman & White, 2012; Costa-Orlandi *et al.*, 2012).

Estudos epidemiológicos no Brasil têm demonstrado a distribuição dos agentes etiológicos responsáveis pelas infecções fúngicas superficiais e cutâneas em várias regiões geográficas. A literatura contém dados coletados e analisados a partir dos estados de São Paulo (Chinelli *et al.*, 2003), Goiás (Costa *et al.*, 2002), Rio Grande do Sul (Aquino, Constante & Bakos, 2007), Santa Catarina (Dos Santos *et al.*, 1997), Minas Gerais (Marchi *et al.*, 1983; Costa-Orlandi *et al.*, 2012), Distrito Federal (Campbell *et al.*, 1984), Amazonas (Furtado *et al.*, 1987), Ceará (Brilhante *et al.*, 2000), Pará (Silveira-Gomes *et al.*, 2013; Pires *et al.*, 2014) e Mato Grosso (Araujo *et al.*, 2012).

1.2.4. Diagnóstico

No diagnóstico laboratorial das dermatofitoses é imprescindível que a coleta do material clínico, assim como a sua conservação e transporte, sejam realizados de forma adequada, já que influenciarão muito no resultado final do exame laboratorial. É importante que o paciente não esteja fazendo uso de medicamentos antifúngicos, mas, caso isso ocorra, é necessário que haja a suspensão do uso do mesmo por pelo menos uma semana antes do início da coleta. A quantidade de material deve ser suficiente para a realização de pelo menos dois exames laboratoriais e na coleta do material biológico, deve-se respeitar a questão do crescimento radial do fungo na lesão, evitando colher material em áreas lesionadas mais antigas, como o centro das lesões na pele e a região distal das unhas infectadas, pois o fungo geralmente se apresenta em menor quantidade ou com pouca viabilidade nestes locais (Weitzman & Summerbell, 1995; Robert & Pihet, 2008).

O diagnóstico da infecção dermatofítica deve ser feito antes do início da terapia antifúngica, devido ao longo tempo de tratamento que é requerido, além do seu alto custo e risco de efeitos adversos. Além disso, é fundamental o conhecimento da origem, principalmente antropofílica ou zoofílica da espécie de dermatófito, para que medidas profiláticas sejam adotadas, como o tratamento de animais de estimação e dos próprios familiares (Robert & Pihet, 2008).

1.2.4.1. Método convencional

No método convencional, após a coleta, condicionamento e transporte adequados, deve-se realizar o exame micológico direto e o cultivo em ágar Sabouraud dextrose e em ágar Mycosel. A identificação é feita pela observação macro e micromorfológica das colônias fúngicas e pelo teste da urease, que diferencia *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* (Weitzman & Summerbell, 1995; Robert & Pihet, 2008). Apesar de ser um teste sensível, rápido e de baixo custo, o exame micológico direto é limitado devido à possibilidade de ambiguidades na interpretação, à necessidade de experiência técnica e de problemas na quantidade e qualidade das amostras (Petinataud *et al.*, 2014).

A metodologia clássica indicada na literatura para a observação da micromorfologia do fungo é o microcultivo em lâmina pela técnica de Ridell, que consiste na obtenção do crescimento de fungos filamentosos em meio pobre em nutrientes, favorecendo a esporulação e o aparecimento das estruturas de frutificação (Lacaz *et al.*, 2002). O teste da urease é baseado na capacidade das espécies produzirem a enzima urease, que hidrolisa a amônia e alcaliniza o meio, fazendo com que a coloração do mesmo vire de amarelo para rosa escuro. (Martins *et al.*, 2006; Robert & Pihet, 2008).

1.2.4.2. Método molecular

A identificação de espécies de dermatófitos pela metodologia clássica tem sido menos utilizada nos laboratórios por ser mais demorada e requerer um nível significativo de conhecimento e especialização tecnológica. Além disso, deve-se considerar o fato de que as espécies de dermatófitos apresentam muita semelhança morfológica, além do polimorfismo e variabilidade. Muitas técnicas moleculares foram desenvolvidas para a identificação desses fungos, principalmente por produzirem resultados rápidos e serem mais simples e reprodutíveis que as técnicas convencionais (Kanbe, 2008).

Uma vez que o DNA é considerado extremamente resistente e pode persistir mesmo na ausência de hifas viáveis, as técnicas de amplificação do DNA, como as reações em cadeia da polimerase (PCR), podem ser úteis no auxílio da identificação convencional (Walberg *et al.*, 2006)

Muitos pesquisadores têm desenvolvido técnicas que permitem a identificação dos dermatófitos em nível de espécie e, várias destas, permitem com que esses fungos sejam diferenciados em nível de cepas. Técnicas baseadas no DNA mitocondrial (mtDNA) e no DNA ribossomal (rDNA), determinando as relações filogenéticas entre espécies desses fungos, entre outras, têm sido descritas, porém, a técnica de RAPD (*Randomly amplified polymorphic DNA*) tem sido utilizada frequentemente para a análise filogenética e a identificação dos dermatófitos (Baeza & Mendes-Giannini, 2004; Baeza *et al.*, 2006; Abdel-Rahman, 2008; Kanbe, 2008; Santos *et al.*, 2010).

Várias abordagens são empregadas para investigar a variação genética de *T. rubrum* e o seu polimorfismo genético está localizado na região NTS ao invés da região ITS. Baeza e colaboradores (2004) estudaram o método de RAPD com dois iniciadores e, nesses estudos, foram encontrados um total de 12 padrões individuais com o primeiro iniciador e 11 com o segundo. Além disso, sugeriram em 2006, que uma combinação de métodos de tipagem como

RAPD e de elementos repetitivos (TRSs) devem ser usados para a diferenciação de *T. rubrum* (Baeza et al., 2006). Já para o complexo *T. mentagrophytes*, marcadores genéticos para a epidemiologia molecular deste grupo têm sido explorados, como a análise de restrição com endonucleases (RFLP), hibridização com poli (dG-dT) e métodos de RAPD. Estudos mostram que todas essas técnicas são úteis para a distinção das duas espécies. Outros estudos relataram que a região NTS do rDNA foi útil para tipagem de várias linhagens de dermatófitos. Além disso, também relataram variações genéticas na região NTS, tanto para *T. mentagrophytes var. mentagrophytes* quanto para *T. mentagrophytes var. interdigitale*. Brilhante e colaboradores (2006) analisaram as características moleculares de *M. canis* isoladas de cão, gato e humanos usando as técnicas de RAPD e PCR-RFLP, demonstrando que todos os isolados de *M. canis* eram geneticamente idênticos, apesar das diferentes características morfológicas (Kanbe, 2008).

A análise do sequenciamento das regiões variáveis do rDNA, especialmente as regiões ITS, definem as sequências de nucleotídeos destas regiões e demonstram as estruturas específicas para cada espécie de dermatófito. De acordo com estudos filogenéticos usando estes dados, os dermatófitos pode ser considerados como um grupo homogêneo com divergências evolutivas recentes, uma vez que todos os dados obtidos a partir de análises moleculares mostram baixa diversidade genética entre as espécies que pertencem a um mesmo gênero (Kanbe, 2008).

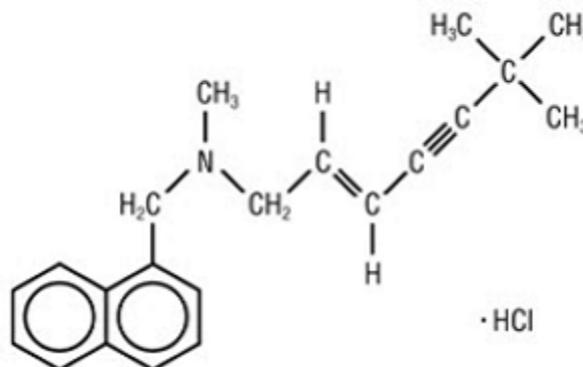
1.2.5. Tratamento

Para o tratamento das dermatofitoses existem poucos fármacos disponíveis e os novos fármacos pertencem basicamente às famílias dos azóis e das anilaminas (Gupta & Cooper, 2008; Martinez-Rossi, Peres & Rossi, 2008). Ambas as famílias de fármacos possuem excelente atividade contra os dermatófitos. Para lesões em estágios iniciais, apenas o tratamento tópico

é indicado e os principais fármacos administrados são o ciclopirox, amorolfina, clotrimazol, miconazol, econazol, tioconazol, nafitina, terbinafina, cetoconazol e nistatina. A terapia tópica usualmente não é tóxica, uma vez que a absorção sistêmica tende a ser mínima. No tratamento das onicomicoses, antifúngicos tópicos possuem baixa eficácia quando usados sozinhos ou com antifúngicos sistêmicos mais antigos, como o cetoconazol, porém quando associados a medicamentos sistêmicos ainda utilizados, como a terbinafina, pode resultar em uma cura mais rápida (Kaur, Kashyap & Bhalla, 2008). Nas lesões extensas ou crônicas e nas onicomicoses e tinea capitis, a utilização de medicamentos orais associados a um medicamento tópico, é mais indicada. Os fármacos sistêmicos mais utilizadas são: cetoconazol, fluconazol, itraconazol, terbinafina e griseofulvina (Gupta & Cooper, 2008; Hay, 2009). No tratamento das onicomicoses, griseofulvina e cetoconazol não são mais utilizados (Gupta, Paquet & Simpson, 2013).

A terbinafina (**Fig.1**) é um fármaco derivado da alilamina, desenvolvido para uso tópico e sistêmico e que tem ação na biossíntese do ergosterol da membrana da célula fúngica através da inibição seletiva e específica da enzima esqualeno epoxidase (Balfour & Faulds, 1992). Esse fármaco demonstrou-se fungicida contra dermatófitos, *Aspergillus* spp., *Scopulariopsis brevicaulis*, *Blastomyces dermatitidis*, *H. capsulatum* e *C. parapsilosis*. No entanto, apresentou efeito fungistático contra *C. albicans* (Balfour & Faulds, 1992).

Figura 1. Estrutura química da terbinafina (Balfour & Faulds, 1992).*



* *Legenda formatada de acordo com as novas regras da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) de 2013.*

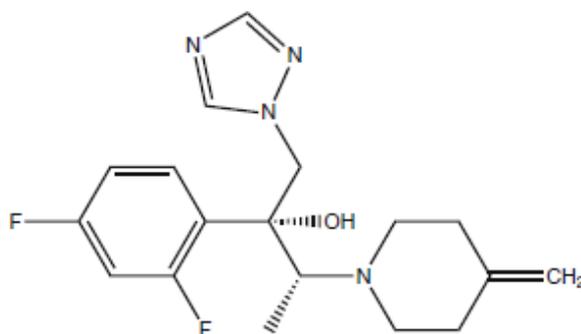
O uso desses medicamentos deve ser feito com cautela e supervisão, devido ao aumento da resistência dos fungos aos antifúngicos, além do risco de interações com outros fármacos. Além disso, muitos desses medicamentos são tóxicos para as nossas células, uma vez que seus alvos celulares são limitados pela sua semelhança com a célula fúngica (ambas eucarióticas) (Martinez-Rossi, Peres & Rossi, 2008). Os fármacos antifúngicos podem causar toxicidade hepática, problemas raros de pele, como a síndrome de Stevens-Johnson e interação com outros fármacos que são metabolizados pelo sistema do citocromo P-450. O uso da terbinafina não é recomendado para pacientes com disfunção prévia no fígado. Além disso, o seu uso pode exacerbar o lúpus cutâneo e sistêmico eritematoso. O itraconazol também pode causar problemas hepáticos e seu uso é proibido em pacientes que tenham alguma disfunção nos ventrículos do coração. A administração de fluconazol deve ser feita com cautela em pacientes diabéticos do tipo 2, que fazem uso de hipoglicemiantes orais. Em pacientes que fazem uso de ciclosporina concomitantemente ao do fluconazol, a creatinina sérica deve ser monitorada, assim como o tempo de protrombina quando esse antifúngico for administrado junto a cumarínicos (Gupta & Cooper, 2008; Gupta, Paquet & Simpson, 2013). Durante o tratamento

prolongado com a griseofulvina e o cetoconazol, as funções hepáticas, renais e hematopoiéticas devem ser constantemente checadas (Martinez-Rossi, Peres & Rossi, 2008).

Embora a terbinafina seja o padrão ouro para o tratamento das dermatofitoses, novos derivados azólicos sistêmicos têm sido desenvolvidos (Gupta & Simpson, 2012). Alguns fármacos tópicos encontram-se em fase clínica, como o ME1111, o qual provou ser efetivo e ter pouco potencial de indução de resistência pelos dermatófitos (Ghannoum, Isham & Long, 2015). Outros como o luliconazol (Feng *et al.*, 2014), efinaconazol (Tosti, 2013) e o tavaborol (Zane *et al.*, 2015), mostraram-se seguros e eficazes (Zeichner, 2015).

O efinaconazol (**Fig.2**) é um novo triazólico utilizado para o tratamento tópico das onicomicoses (Iwata *et al.*, 2014). Possui atividade potente contra os dermatófitos quando comparado à terbinafina e à amorolfina, além de apresentar melhor atividade contra *Malassezia* spp, *Candida* spp. e outros fungos filamentosos que o itraconazol e até mesmo que o fluconazol, dependendo da espécie (Lipner & Scher, 2015). A solução tópica a 10%, denominada comercialmente como Jublia[®], foi desenvolvida pela *Valeant Pharmaceuticals International* e recebeu sua primeira aprovação global no Canadá, em outubro de 2013. Em 2014, o seu uso foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos e também pelo órgão responsável no Japão. O mecanismo de ação do efinaconazol é semelhante ao dos outros azólicos, sendo assim, ele atua na inibição da síntese do ergosterol, inibindo a enzima 14 α demetilase, envolvida na conversão do lanosterol para o ergosterol, resultando em outras mudanças degenerativas secundárias nas células (Patel & Dhillon, 2013).

Figura 2. Estrutura química do efinaconazol (Patel & Dhillon, 2013).



Mesmo com todo o tratamento disponível, a recidiva das infecções fúngicas é um grande problema, principalmente na tinea pedis e onicomicoses. Deve ser feito um acompanhamento adequado junto ao médico, a fim de controlar e tratar fatores predisponentes a essas micoses bem como a educação dos pacientes em relação à manutenção de uma boa higiene (Gupta & Cooper, 2008; Kaur, Kashyap & Bhalla, 2008; Costa-Orlandi *et al.*, 2012).

1.2.6. Biofilmes

Biofilmes são comunidades sésseis estruturadas de microrganismos que se agrupam de maneira organizada em uma superfície ou que se aderem uns aos outros, dentro de uma matriz extracelular polimérica que eles mesmos produzem (Ramage *et al.*, 2009). A formação do biofilme dá muitas vantagens aos microrganismos, entre elas, a proteção contra o meio ambiente; a comunicação microbiana; o aumento da virulência; a promoção da cooperação metabólica e o surgimento de uma comunidade baseada na regulação da expressão gênica (Percival *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, houve um aumento da valorização do papel que o biofilme desempenha na medicina humana, primeiro porque os microrganismos que crescem dentro de um biofilme apresentam características fenotípicas totalmente diferentes das que quando esse mesmo microrganismo se apresenta na forma planctônica. Além disso, os microrganismos em

comunidade também possuem resistência aumentada aos agentes antimicrobianos e maior proteção contra as defesas do hospedeiro (Ramage *et al.*, 2009).

Assim como as bactérias, os fungos também são capazes de formar biofilmes, o que têm aumentado sua significância clínica e também causado problemas econômicos, uma vez que são organismos eucariotos e, portanto, mais complexos que as bactérias. Além disso, a maioria das doenças causadas pelos fungos é negligenciada, dificultando o diagnóstico e o tratamento, acarretando altas taxas de mortalidade. Espécies de *Candida* (Pires, Santos, *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2012; Sardi *et al.*, 2013), *Cryptococcus* (Martinez & Casadevall, 2006; Ajesh & Sreejith, 2012), *Malassezia* (Figueredo *et al.*, 2012), *Trichosporon* (Colombo, Padovan & Chaves, 2011), *Saccharomyces* (Bojsen, Andersen & Regenberg, 2012), *Aspergillus* (Muszkietta *et al.*, 2013), *Histoplasma* (Pitanguí *et al.*, 2012), *Fusarium* (Machado Vila, Sousa Quintanilha & Rozental, 2015), *Paracoccidioides brasiliensis* (Sardi *et al.*, 2015) entre outras, têm sido descritas como capazes de formar biofilmes.

Os fungos são especialmente adaptados para crescer em superfícies e são excelentes candidatos para a formação de biofilmes, porém esse aspecto ainda é pouco entendido quando comparado aos estudos com biofilmes bacterianos. Existem muitos modelos, critérios e fenótipos bem definidos quando se trata dos biofilmes formados por leveduras (Harding *et al.*, 2009). Além disso, os biofilmes formados por leveduras são facilmente mais comparáveis aos biofilmes formados pelas bactérias do que aos biofilmes formados pelos fungos filamentosos. Embora muitas espécies de leveduras sejam dimórficas e possam se converter para a fase filamentosa, é esperado que os biofilmes de fungos filamentosos tenham características morfológicas distintas tanto dos biofilmes formados por leveduras, quanto dos biofilmes formados por bactérias (Harding *et al.*, 2009).

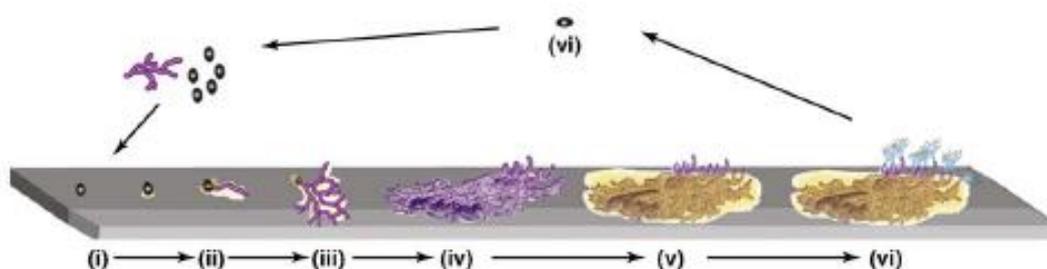
Embora sejam poucos os relatos na literatura sobre e a utilização da palavra “biofilme” quando se trata dos fungos filamentosos, muitas são as evidências indicativas de formação de

biofilmes por esses fungos nas áreas médica, ambiental e industrial. Atualmente sabe-se que esses fungos são capazes de formar biofilmes e que esses são diferentes tanto dos biofilmes formados por leveduras, quanto dos biofilmes formados por bactérias. Harding e colaboradores (2009), propuseram alguns critérios para a evidência de formação de biofilmes pelos fungos filamentosos, como o crescimento em forma de agregados complexos, em camadas, diferente do crescimento em monocamada; crescimento associado a uma superfície (após a adesão); células embebidas em uma matriz extracelular produzida pelo próprio fungo; aumento da tolerância a compostos antimicrobianos ou biocidas; presença de mudanças fisiológicas e mudanças na secreção de enzimas ou metabólitos.

Os mesmos autores propuseram um modelo para os biofilmes de fungos filamentosos, que inclui seis estágios (**Fig. 3**):

- 1 – Adsorção, associação ou adesão inicial de células ou conídios a uma superfície (interação físico-química dos propágulos, fragmentos de hifas, esporos, entre outros com a superfície);
- 2 – Adesão (através da presença de apêndices e exopolissacarídeos (adesinas) que promovem a adesão e a agregação de células);
- 3 – Formação de microcolônia I (multiplicação celular, agregação de célula com célula, o recrutamento de células que estejam flutuando no meio, produção aumentada de exopolissacarídeos que permitem que o biofilme cresça fortemente aderido ao substrato);
- 4 – Formação de microcolônia 2 (formação de redes de hifas compactas, em camadas, embebidas por matriz extracelular polimérica e a formação de canais de água);
- 5 – Maturação ou desenvolvimento reprodutivo (Máxima cobertura da superfície pelas colônias, máxima espessura e, dependendo da espécie fúngica, desenvolvimento de corpos de frutificação);
- 6 – Dispersão dos esporos, microconídios ou dos fragmentos de hifas (as células planctônicas são lançadas do biofilme para completar um novo ciclo).

Figura 3. Modelo de formação de biofilmes em fungos filamentosos. (i) adsorção, (ii) adesão, (iii) formação de microcolônia 1, (iv) formação de microcolônia 2, (v) desenvolvimento do biofilme maduro, (vi) dispersão (Harding et al, 2009).



Os biofilmes possuem estruturas difíceis de erradicar e tratar com o arsenal atual disponível de agentes antifúngicos. Além disso, não existem protocolos definidos para a gestão clínica desses biofilmes e não há treinamento para o diagnóstico e a identificação de uma infecção fúngica em formato de biofilme. Evidências clínicas podem mostrar claramente um papel significativo para as infecções por biofilmes fúngicos, nos quais a remoção do dispositivo infectado e ou a intervenção cirúrgica podem ser as únicas opções para uma gestão eficaz da infecção. As equinocandinas e as formulações lipossomais de anfotericina B são atualmente as terapias anti-biofilme mais eficazes contra os biofilmes fúngicos. O azólicos, no entanto, geralmente não são capazes de destruir essas comunidades (Ramage, Robertson e Williams, 2014).

1.2.7. Ácido protocatecuico

O ácido protocatecuico (ácido 3,4- dihidroxibenzóico) é um composto fenólico, derivado do ácido benzóico, produzido pelo metabolismo secundário de plantas. Os ácidos fenólicos caracterizam-se pela presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na estrutura. Pode ser encontrado em quase

todos os materiais vegetais, incluindo alimentos, frutas e nozes. Juntamente com os seus derivados naturais e sintéticos, tem sido associado a um amplo espectro de ações biológicas e é conhecido por ter funções antioxidantes, pró-apoptóticas, anti-inflamatórias, funções antimelanogênicas, anticarcinogênicas, entre outras (Soares *et al.*, 2014).

No entanto, o principal interesse do ácido protocatecuico e seus derivados é por suas propriedades antimicrobianas. Tem sido reportado que o ácido protocatecuico possui atividade contra *Campylobacter* spp. e *Helicobacter pylori* susceptíveis e resistentes aos antibióticos, além de apresentar uma atividade fungicida contra *Saccharomyces cerevisiae*. Além disso, nosso grupo tem estudado a atividade do ácido protocatecuico e de seus derivados semissintéticos contra várias espécies de fungos. Soares e colaboradores (2014) comprovaram a atividade anti-dermatofítica *in vitro* de seis protocatecuatos contra linhagens de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* e demonstraram que o emprego dessas substâncias pode ser promissor para o desenvolvimento de novos protótipos antifúngicos.

1.2.8. Nanopartículas de óxido nítrico (NO-np)

O óxido nítrico (NO) é uma molécula endógena, diatômica, simples, com funções fisiológicas importantes, principalmente com relação às defesas durante a infecção (Friedman *et al.*, 2008; Schairer *et al.*, 2012). Cada isoforma (eNOS – óxido nítrico sintase endotelial, nNOS- óxido nítrico sintase neuronal e iNOS – óxido nítrico sintase induzida) difere consideravelmente em relação à regulação, amplitude e duração da produção de NO, assim como na sua distribuição celular e tecidual (Schairer *et al.*, 2012). Na pele, as isoformas de NO são sintetizadas e liberadas por diversos tipos celulares, como melanócitos, adipócitos, células endoteliais, macrófagos, neutrófilos, fibroblastos e queratinócitos. A reatividade do NO é diversificada e extensa, devido em grande parte à sua composição eletrônica que permite interações variadas e reações com numerosos reagentes biomoleculares (Friedman *et al.*, 2008).

O NO é um gás instável em ambiente com oxigênio, portanto, reage com o oxigênio e/ou radicais superóxido, resultando em espécies reativas de óxido de nitrogênio (RNOS) e em intermediários de oxigênio (ROS) que causam danos oxidativos e nitrosativos através da alteração do DNA, inibição de enzimas e indução da peroxidação lipídica, que são responsáveis pela maioria das propriedades antimicrobianas do óxido nítrico (Schairer *et al.*, 2012). Por serem lipofílicas, as moléculas de NO atravessam facilmente as barreiras fisiológicas e, conseqüentemente, atingem a maioria das células-alvo com certa facilidade. O NO pode se difundir ao longo de um gradiente de concentração, o que lhe permite um movimento rápido a partir de uma célula para outra, independente de receptores e de canais. Além disso, ele possui alta reatividade e meia-vida curta e é rapidamente eliminado por moléculas onipresentes, como a mioglobina e hemoglobina, sendo assim, o seu local de ação deve ser muito próximo ao local onde ele é gerado (Friedman *et al.*, 2008).

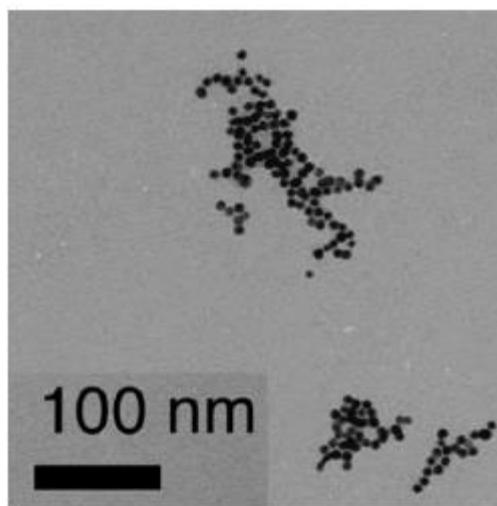
Dependendo da sua concentração, o óxido nítrico exerce efeito antimicrobiano de duas maneiras: em concentrações baixas, o NO age como molécula sinalizadora que promove o crescimento e a atividade de células do sistema imune e, em concentrações altas (acima de 1 μ M), as moléculas de NO se ligam covalentemente ao DNA, proteínas e lipídios, inibindo ou matando os patógenos alvos (Schairer *et al.*, 2012).

Sistemas de entrega de NO exógeno utilizam as propriedades imunorreguladoras e antimicrobianas do óxido nítrico para tratar doenças infecciosas. Vários sistemas de liberação de óxido nítrico têm sido desenvolvidos na tentativa de proporcionar a entrega de óxido nítrico de uma forma segura, eficaz e conveniente (Schairer *et al.*, 2012). Friedman e colaboradores (2008) desenvolveram uma plataforma de liberação de óxido nítrico estável e de baixo custo, utilizando nanotecnologia baseada em um hidrogel de silano. Além disso, essa plataforma é beneficiada a partir da presença de quitosana, que também possui atividade antimicrobiana. A quitosana é um polímero derivado do exoesqueleto de crustáceos que se liga e rompe a parede

celular e membrana de microrganismos devido à sua carga catiônica em ambientes fracamente ácidos (Schairer *et al.*, 2012). A base fundamental destas nanopartículas envolve moléculas de nitrito (NO_3^-) envolvidas dentro de uma matriz estrutural, cuja composição consiste de tetrametil ortossilicato, polietilenoglicol, quitosana e uma rede de vidro de açúcar. Como parte da síntese de nanopartículas, o NO_3^- é termicamente reduzido para facilitar a produção da intrapartícula de NO (Sanchez, Nosanchuk & Friedman, 2012). Posteriormente, durante o processo de liofilização, o sol-gel é convertido a um pó fino, que convenientemente apresenta uma vida útil longa. Quando introduzidas em ambiente aquoso, as nanopartículas se inturmesce, formando poros que permitem a liberação sustentada do NO em diferentes períodos de tempo.

Os estudos de caracterização dessas nanopartículas evidenciaram populações homogêneas medindo aproximadamente 10 nm por partícula e cerca de 130 nm por agregado (**Fig. 4**), sendo assim, essas partículas em nano escala podem atingir o alvo contra os agentes infecciosos, que são guardados por uma variedade de barreiras fisiológicas. Para validação do seu potencial terapêutico, estudos citotóxicos foram realizados *in vitro* e *in vivo*. Cultura de fibroblastos submetidos ao tratamento por nanopartículas de óxido nítrico (NO-np) demonstraram pouca ou nenhuma toxicidade; quando as NO-np foram introduzidas em modelos de ratos e hamsters topicamente e por via intravenosa, nenhuma citotoxicidade foi revelada (Friedman *et al.*, 2008; Sanchez, Nosanchuk e Friedman, 2012). Observando seu custo relativamente baixo, facilidade de síntese e durabilidade, esta plataforma em nano escala fornece um veículo promissor para a entrega antimicrobiana.

Figura 4. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) das nanopartículas de óxido nítrico (NO-np) (Friedman, *et al.*, 2008).



A atividade antimicrobiana dessas nanopartículas de óxido nítrico tem sido relatada com sucesso na literatura, apresentando atividade bacteriostática ou bactericida contra *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) (Martinez *et al.*, 2009), *Acinetobacter baumannii* (Mihu *et al.*, 2010), *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (Friedman *et al.*, 2011). Além das bactérias, essas nanopartículas foram também eficazes contra espécies de fungos como *Candida albicans* (Macherla *et al.*, 2012) e *Trichophyton mentagrophytes* (dados não publicados) (Schairer *et al.*, 2012).

É importante também ressaltar o papel do NO na cicatrização de feridas, funcionando como mediador na maturação dos queratinócitos, angiogênese e na deposição do colágeno. Baseado nessa função, as nanopartículas também foram testadas *in vivo* em feridas causadas por microrganismos e foi demonstrada uma diminuição no infiltrado de neutrófilos e da carga bacteriana, resultando em cura rápida (Martinez *et al.*, 2009; Sanchez, Nosanchuk e Friedman, 2012).

Os fungos são organismos eucariotos e as suas células são muito semelhantes à célula animal. As exceções são a presença de parede celular e do ergosterol em lugar do colesterol

como lipídio de membrana, o que faz com que ambos sejam os principais alvos dos fármacos antifúngicos. O aumento da resistência aos antimicrobianos, em conjunto com o número restrito de antifúngicos disponíveis comercialmente e que ainda apresentam muitos efeitos adversos, são a causa do aumento da morbidade e mortalidade pelas infecções fúngicas (Martins *et al.*, 2009), portanto, há a necessidade do desenvolvimento de antifúngicos novos e mais eficazes.

No caso das bactérias, apesar das muitas estratégias de desenvolvimento de antimicrobianos eficazes contra bactérias planctônicas, a maioria raramente é testada ou eficaz contra os biofilmes formados por elas (Hetrick *et al.*, 2009) e pode-se dizer que o mesmo acontece com os fungos. Em relação a estes, a formação de biofilmes é cada vez mais evidente em diversas espécies, o que clinicamente é muito importante, pois essa formação é refratária ao tratamento antifúngico, representando um grande problema, pois a dose necessária para erradicar o biofilme pode exceder as mais altas concentrações terapêuticas recomendadas aos antimicrobianos (Ramage *et al.*, 2012). Logo, novas abordagens para o tratamento de biofilmes são uma necessidade urgente.

A habilidade dos dermatófitos na formação dos biofilmes ainda não foi descrita, porém acredita-se que ela esteja relacionada com a resistência desses fungos à terapia antifúngica (Vlassova *et al.*, 2011). Sendo assim, esse trabalho objetiva verificar a capacidade dos dermatófitos de formação de biofilmes e desenvolver protótipos com atividade contra as células planctônicas e em formato biofilme desses fungos.

Para melhor compreensão, o presente trabalho foi dividido em duas partes: a primeira relacionada ao doutorado no Brasil, sob a orientação da Prof.^a Dra. Maria José Soares Mendes Giannini e co-orientação da Prof. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida e a segunda, referente ao doutorado sanduíche realizado na Albert Einstein College of Medicine da Yeshiva University sob a orientação do Prof. Dr. Joshua Daniel Nosanchuk.

Parte I: Caracterização dos biofilmes de dermatófitos e desenvolvimento de protótipos anti-dermatófitos nas formas planctônica e biofilme a partir de derivados sintéticos do ácido protocatecuico.

Objetivos
(Parte I)

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar a formação de biofilmes por dermatófitos, avaliar a sensibilidade das cepas ATCC e isolados clínicos desses fungos frente aos antifúngicos fluconazol, griseofulvina, terbinafina, itraconazol, nistatina, miconazol e derivados sintéticos do ácido protocatecuico e desenvolver protótipos anti-dermatófitos nas formas planctônica e biofilme a partir do derivado do ácido protocatecuico com melhor índice de seletividade, determinando sua toxicidade e eficiência *in vitro*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confirmar a identificação morfofisiológica dos isolados clínicos de dermatófitos através do sequenciamento da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*);
- Verificar e caracterizar a formação de biofilme *in vitro* pelas diversas espécies de dermatófitos;
- Avaliar a sensibilidade dos derivados sintéticos do ácido protocatecuico e dos fármacos de referência mais utilizados na clínica (miconazol, nistatina, itraconazol, fluconazol, terbinafina e griseofulvina) contra os isolados clínicos e cepas ATCC de dermatófitos;
- Verificar a citotoxicidade dos derivados do ácido protocatecuico em linhagens celulares HaCat (queratinócitos de pele humana), NHOK (queratinócitos normais de mucosa oral humana) e HepG2 (células de hepatoma humano);
- Avaliar a sensibilidade *in vitro* dos fármacos convencionais e dos derivados do ácido protocatecuico contra células planctônicas e biofilmes pré-formados de dermatófitos;
- Avaliar a interação da combinação entre o composto derivado do ácido protocatecuico e o fármaco com melhor atividade anti-biofilme nas células de dermatófitos.

Material e Métodos
(Parte I)

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. AMOSTRAGEM

Para a realização desse trabalho foram utilizadas cepas de referência de *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. gypseum* e *M. canis* (*T. rubrum* ATCC 28189, *T. mentagrophytes* ATCC 11481, *M. gypseum* ATCC 14683 e *M. canis* ATCC 32903), pertencentes à coleção do Laboratório de Micologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP e isolados clínicos de pacientes do Ambulatório de Dermatologia da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, MG (*T. rubrum* 13, *T. rubrum* 34, *T. rubrum* 65, *T. rubrum* 69, *T. rubrum* 70, *T. rubrum* 143, *T. mentagrophytes* 66 e *M. gypseum* 180, pertencentes ao Laboratório de Micologia, do Departamento de Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (COEP/UFMG/ETIC Proc. No. 0476.0.203.000-09 e CEP/Santa Casa Proc. No. 094/2009).

3.2. CULTIVO DOS DERMATÓFITOS

Todas as cepas e isolados clínicos foram cultivados em ágar Sabouraud dextrose (Difco, BD biosciences) acrescido de cloranfenicol a 0,1% e/ou em ágar Mycosel (Difco, BD biosciences) e incubadas à temperatura de 28°C por até 15 dias (Costa-Orlandi *et al.*, 2012).

3.3. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

A maioria dos isolados utilizados nesse trabalho foi identificada pela observação das características macro e micro morfológicas e pela utilização de testes bioquímicos, como a prova da urease. No entanto, nos últimos anos, as características genótípicas provaram ser mais eficazes e precisas na identificação dos dermatófitos do que as características fenotípicas, além do fato de muitas linhagens perderem sua atividade sexual com o tempo e não desenvolverem as estruturas de frutificação, fundamentais na identificação microscópica (Santos *et al.*, 2010).

Sendo assim, faz-se necessária a confirmação da espécie pelo método molecular. Para a identificação molecular foi utilizado o sequenciamento da região ITS.

3.3.1. Extração e purificação do DNA

Para a extração do DNA, as cepas foram cultivadas em caldo Sabouraud dextrose (Difco, BD biosciences) suplementado com cloranfenicol a 0,05% e incubadas com agitação (100 RPM) à temperatura de 28°C por até 10 dias. Os micélios foram retirados com a ajuda de uma alça estéril descartável e colocados em um gral de porcelana estéril contendo nitrogênio líquido e macerados com um pistilo. Aproximadamente 500 µL de cada micélio pulverizado com nitrogênio foram transferidos para um tubo de *Eppendorf* contendo 500 µL de tampão de lise (10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; 1% de dodecil sulfato de sódio- SDS) e 100 µg/mL de proteinase K. Os microtubos foram agitados e incubados a 37°C por 1 hora. Em seguida, 200 µL de NaCl 5M foram adicionados e a mistura foi novamente incubada por 10 minutos, à temperatura de 65°C. Cem microlitros de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) a 10% foram adicionados, com incubação a 65°C, por 20 minutos. A solução foi então tratada com 7,5 µL de solução de RNase A na concentração final de 50 µg/mL, incubada a 37°C por 1 hora, finalmente extraída com um volume igual de solução de fenol clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugada a 12.000 rpm, a 4°C, por 15 minutos. Esse procedimento foi repetido por no mínimo três vezes, dependendo da quantidade de pigmento do isolado. O DNA foi precipitado com a adição 1/10 de volume de acetato de sódio 3M (NaOAc) e 2 volumes de etanol absoluto, com incubação a -20°C por 3 horas e ressuspendido com 50 µL de tampão de extração (40 mM Tris/HCl, pH=8; 2 mM EDTA). Por fim, o DNA foi dosado e teve sua pureza avaliada em espectrofotômetro *NanoVue™ Plus Spectrophotometer* (GE Healthcare Lifescience). Além disso, as amostras foram visualizadas em gel de agarose 0,8% (Baeza e Giannini, 2004; Baeza *et al.*, 2006).

3.3.2. Amplificação da região ITS pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações de amplificação da região ITS foram realizadas utilizando-se 10 pmol de cada primer ITS1 (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'); 2,5 µL de MgCl₂ (25 mM); 0,5 µL de um mix de dNTP's (5 mM); 5 µL de tampão da Taq 10 X; 1U unidade de Taq DNA Polimerase e 20 ng de DNA em uma reação de volume total de 50 uL. As reações foram realizadas em termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Life Technologies), seguindo o seguinte programa: 95°C por 5 minutos, seguidos de 45 ciclos de 95°C por 30 segundos; 56°C por 15 segundos e 72°C por 65 segundos. Após os ciclos, as amostras foram incubadas por 5 minutos a 72°C, seguido de resfriamento a 4°C. A reação foi então verificada em gel de agarose 1% em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1X e, em seguida, as amostras foram coradas com GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium), sendo as bandas visualizadas com o auxílio de luz UV. Após a verificação da amplificação, os produtos das PCRs foram purificados utilizando o kit de purificação QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Após a purificação, os produtos de PCR foram dosados e tiveram a pureza avaliada utilizando-se o aparelho NanoVue™ Plus Spectrophotometer (GE Healthcare Lifescience).

3.3.3. Sequenciamento e análise dos produtos da PCR

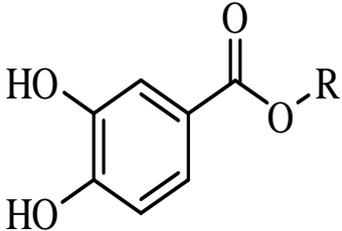
O sequenciamento dos produtos de PCR foi feito de acordo com Sanger, Nicklen & Coulson (1977), com modificações, como a utilização de dideoxinucleotídeos fluorescentes e o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems), utilizando sequenciador automático modelo ABI Prism 3130 (Applied Biosystems). Em resumo, as reações de sequenciamentos foram realizadas separadamente para cada iniciador, com a adição de 1 µL de iniciador (5 µM); 2 µL de tampão de sequenciamento 2X; 40 ng de produto de PCR e 2 µL de BigDye® (mix com a enzima para amplificar e os nucleotídeos com a fluorescência). As

reações foram realizadas em termociclador *Veriti 96-Well Thermal Cycler (Life Technologies)*, seguindo o seguinte programa: 96°C por um 1 minuto; seguido por 25 ciclos de 96°C por 10 segundos; 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. Após a reação, os produtos foram purificados utilizando o kit *BigDye X Terminator® Purification Kit (Applied Biosystems)*, que contém uma resina que purifica o DNA e retém as impurezas, como sais e nucleotídeos que não foram incorporados. Em seguida, os produtos incorporados à resina foram vortexados por 30 minutos e os sobrenadantes foram aplicados em placas específicas para o sequenciador ABI Prism 3130. As sequências obtidas foram analisadas utilizando os programas *Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn)* (Altschul *et al.*, 1990), disponível no site <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

3.4. OBTENÇÃO DOS FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS E DOS COMPOSTOS DERIVADOS DO ÁCIDO PROTOCATECUICO

Os fármacos antifúngicos fluconazol, griseofulvina, terbinafina, itraconazol, nistatina e miconazol foram adquiridos comercialmente (*Sigma-Aldrich*) e os compostos sintéticos derivados do ácido protocatecuico foram cedidos pelos grupos de pesquisa da Prof.^a Dra. Dulce Helena Siqueira Silva, do Instituto de Química da UNESP-Araraquara e do Prof. Dr. Luís Octávio Regasini, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP-São José do Rio Preto. Inicialmente o ácido protocatecuico foi isolado da planta *Cupania oblongifolia*, conhecida popularmente como pau-magro, por meio dos projetos Biota e Bioprospecta – FAPESP. Esse composto sofreu modificações em sua estrutura com a adição de cadeias carbônicas através de reações de esterificação, como descrito por Soares e colaboradores (2014) (**Fig. 5**).

Figura 5. Estrutura molecular do ácido protocatecuico e seus ésteres (Soares, 2011).

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

Nesse trabalho, foram utilizados todos os compostos descritos na **Fig. 5**, com exceção dos protocatecuatos de heptila e octila, que não puderam ser produzidos até a realização dos testes.

3.5. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE DERMATÓFITOS AOS ANTIFÚNGICOS E COMPOSTOS SINTÉTICOS PELA TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO

3.5.1. Diluição dos fármacos

Para todos os fármacos, foram preparadas soluções-estoque considerando sua pureza, através de cálculos preconizados no documento M38-A2, proposto pelo CLSI (2008a). Em seguida, as soluções-trabalho foram preparadas através da diluição das soluções-estoque em meio RPMI-1640 com glutamina, sem bicarbonato e com vermelho de fenol como indicador de pH (*Gibco*[®]) e tamponado com MOPS - [ácido 3-(N-morfolina) propanossulfônico] (*Sigma-Aldrich*), pH=7, nas proporções de 1:100 (fármacos diluídos em DMSO - griseofulvina, terbinafina, itraconazol, nistatina e miconazol) ou 1:10 (fármacos diluídos em solventes aquosos - fluconazol) e colocadas nas placas de 96 poços. Para o teste de sensibilidade dos

fungos dermatófitos, os fármacos foram testados nos seguintes intervalos de concentração: 64 a 0,125 mg/L para griseofulvina e fluconazol; 16 a 0,0313 mg/L para nistatina e miconazol e 0,5 a 0,001 mg/L para terbinafina e itraconazol.

3.5.2. Diluição dos compostos derivados do ácido protocatecuico

Os compostos foram diluídos assepticamente em DMSO e solubilizados com o auxílio do vórtex. Foram realizados cálculos para determinação da quantidade de cada substância testada para que a concentração inicial na placa de microdiluição fosse 62,5 mg/L. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas até que a concentração final na placa fosse de 0,06 mg/L.

3.5.3. Preparo do inóculo

Para o preparo do inóculo, os dermatófitos foram cultivados em ágar batata dextrose (Difco, BD biosciences) e incubados à temperatura de 28-30°C por sete dias ou até que houvesse esporulação. As culturas foram então cobertas com 5 mL de solução salina estéril a 0,85%, e uma suspensão de conídios foi preparada com a ajuda de uma zaragatoa estéril, gentilmente passada nas colônias. Os inóculos foram preparados em meio RPMI-1640 tamponado e ajustados com a contagem dos conídios no hematócrito, de modo a atingir uma concentração final na placa de 3×10^3 células/mL. Em seguida, 100 µL foram distribuídos nas placas de 96 poços, juntamente aos seus respectivos controles: o controle de esterilidade do meio, contendo 200 µL do meio RPMI-1640 e o controle de crescimento, contendo 100 µL do meio RPMI e 100 µL do inóculo. Por fim, as placas foram incubadas sem agitação a 35°C por 5 dias e foram realizadas leituras visual e espectrofotométrica na densidade óptica de 490 nm. Todos os testes foram realizados em triplicata.

3.5.4. Controle de qualidade

Para o controle de qualidade dos testes com os fármacos antifúngicos, foram utilizadas as cepas de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258, de acordo com o documento M27-A3, proposto pelo CLSI (2008b). As cepas foram subcultivadas em ágar Sabouraud dextrose (Difco, BD biosciences) e incubadas por 24 horas a 35°C. Em seguida, foram preparadas suspensões das colônias em solução salina estéril a 0,85% e os inóculos foram ajustados com a contagem das células leveduriformes no hematocítômetro de modo a atingir uma concentração final na placa de microdiluição correspondente a $2,5 \times 10^3$ células/mL. As suspensões foram preparadas em meio RPMI, colocadas em contato com os fármacos e os compostos nas placas de microdiluição, juntamente com seus respectivos controles e incubadas a 35°C sem agitação, por 48 horas.

3.5.5. Análise morfológica da sensibilidade dos isolados clínicos e cepas ATCC frente aos derivados do ácido protocatecuico

Para a melhor visualização do teste de sensibilidade e verificação do comportamento dos isolados clínicos e cepas ATCC de dermatófitos frente aos compostos e aos antifúngicos comerciais, as placas de microdiluição foram analisadas após as 96 horas de incubação no equipamento *In Cell Analyser 2000* (GE Healthcare). As imagens de microscopia óptica foram capturadas e analisadas no software *In Cell Investigator Image Analysis* (GE Healthcare).

3.6. CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

A determinação da Concentração Fungicida Mínima foi realizada conforme descrito por Soares e colaboradores (2014). Placas de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose (Difco, BD biosciences) foram previamente demarcadas de acordo com as posições das diluições dos compostos e controles positivos na placa de 96 poços. Uma alíquota do conteúdo dos poços foi

transferida para o respectivo local na placa de Petri com o auxílio de um palito de madeira estéril e as placas foram incubadas a 35°C por 96 horas. A concentração fungicida mínima é definida como a menor concentração do composto ou fármaco onde não ocorre o desenvolvimento de microrganismos.

3.7. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO DA SULFORODAMINA B

3.7.1. Cultura de células

Nos ensaios de citotoxicidade foram utilizadas linhagens de células NHOK (*normal human oral keratinocytes* - queratinócitos de mucosa oral humana normais, imortalizados com o gene *h-tert*, doadas pelo Departamento de Medicina da *Harvard Medical School- Dr. Karl Munger*), HepG2 (células de hepatoma humano, obtidas do banco de células do Rio de Janeiro) e HaCat (queratinócitos normais de pele humana). As linhagens foram mantidas em garrafas próprias para cultivo de células, juntamente com o meio específico (NHOK-meio para queratinócitos; HepG2 e HACAT-DMEM), contendo 10% de soro fetal bovino e 10 mL/L de uma solução de antibióticos A5955 (*Sigma-Aldrich*), contendo estreptomicina 10 mg/mL, penicilina 10000 u/mL e anfotericina B 25 µg/mL e incubadas em estufa em condições padrão (37°C, 5% CO₂) (Escobar, Afonso & Aristizabal, 2009).

3.7.2. Montagem das placas

As culturas celulares que obtiveram 90% de confluência tiveram os seus meios de cultivo retirados e foram lavadas com 4 mL PBS para que fosse eliminado o excesso de meio com o soro fetal bovino. Em seguida, foram tratadas com 2 mL de solução de tripsina durante 5 minutos a 37°C. As células tripsinizadas foram colocadas em tubos Falcon estéreis de 50 mL e centrifugadas, a fim de separá-las da tripsina. As linhagens foram então ressuspensas em seus

meios de cultura para serem contadas na câmara de Newbauer, de forma a obter uma concentração de 1×10^5 células por poço na placa de microdiluição. Cem microlitros das suspensões de NHOK e HepG2 foram semeados em placas de 96 poços incubados a 37°C com tensão de 5% de CO₂. Após 24 h de incubação para a HepG2 e 48 horas para a NHOK, 100 µL das várias concentrações das diluições seriadas dos derivados do ácido protocatecuico nos meios específicos de cada célula (nas concentrações de 62,5 a 0,06 mg/L), foram colocados em contato com as células. As placas foram então incubadas por mais 24 horas nas mesmas condições. Fluconazol foi utilizado como controle, no intervalo de concentração de 64 a 0,125 mg/L. O crescimento celular foi avaliado através do método colorimétrico de sulforodamina B, previamente descrito por Skehan e colaboradores (1990), com algumas modificações.

3.7.3. Método colorimétrico da sulforodamina B

As células foram fixadas com 50 µL de ácido tricloroacético a 50% à temperatura de 4°C por 1h, lavadas de 3 a 4 vezes com água destilada e secas à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 50 µL de solução de sulforodamina B a 0,4% em cada poço e as placas foram incubadas a 4°C por 20 min. Os poços foram cuidadosamente lavados por cerca de 3 a 4 vezes com solução de ácido acético a 1%, até que o excesso de corante fosse removido. Para avaliação do crescimento celular, foram adicionados 100 µL de Tris base 10 mM em cada poço, as placas foram levemente agitadas e as leituras realizadas em leitor de ELISA (BioRad modelo 3550) em densidade óptica (DO) de 570 nm. A porcentagem de células viáveis foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Células viáveis} = \text{média do teste} \times 100 / \text{média do controle negativo}$$

Como controles de cada placa foram utilizados peróxido de hidrogênio a 10%, considerando sua potência (controle positivo) e células não tratadas (controle negativo). Após a análise da viabilidade, foram calculados os valores de IC₅₀ (concentração onde ocorre 50%

de morte celular) e o índice de seletividade (IS), que é determinado pela razão dos valores de IC_{50} pela concentração inibitória mínima (CIM).

3.8. ENSAIO DE FORMAÇÃO DO BIOFILME *in vitro*

O ensaio foi realizado baseado no método descrito por Mowat e colaboradores (2007) para a formação de biofilme de *Aspergillus fumigatus*, com modificações. Em resumo, as cepas de dermatófitos foram cultivadas em ágar batata dextrose (Difco, BD biosciences) e incubadas a 28°C por 7 dias ou até que houvesse esporulação. Os inóculos foram preparados cobrindo as culturas com 5 mL de solução salina estéril a 0,85% e ajustados com a contagem dos conídios no hemocitômetro, de modo a atingir uma concentração final de 1×10^6 UFC/mL. Em seguida, 1000 μ L do inóculo foram adicionados a placas de 24 poços (TPP®, *Trasadingen, Switzerland*) contendo ou não lamínulas previamente esterilizadas. Para as placas de 96 poços, foram adicionados 200 μ L de inóculo. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 3 a 4 horas, sem agitação, para que fosse realizada a pré-adesão do biofilme. Após esse período, o sobrenadante foi gentilmente removido dos poços e os mesmos foram lavados por cerca de 2 a 3 vezes com solução salina estéril para a remoção das células não aderentes. Por fim, 1000 μ L e 200 μ L de meio RPMI 1640 foram adicionados aos poços das placas de 24 e 96 poços, que foram novamente incubadas a 37°C por até 96 horas.

3.8.1. Análise morfológica do biofilme

Os biofilmes formados foram observados através de microscopia óptica no equipamento *In cell Analyser* (GE Healthcare), nos tempos de 12, 24, 48 e 72 horas. A análise das imagens foi feita pelo software *In Cell Investigator Image Analysis*.

3.8.2. Determinação da atividade metabólica do biofilme pelo ensaio de redução de XTT

As atividades metabólicas dos biofilmes de 04 cepas clínicas (*T. rubrum* 143, *T. rubrum* 108, *T. rubrum* 65 e *T. mentagrophytes* 66) e de 2 ATCC's (*T. rubrum* 28189 e *T. mentagrophytes* 11481) foram verificadas através do ensaio de redução de XTT. Em seguida foram feitas as curvas de crescimento dos biofilmes das cepas com os melhores valores. O ensaio de redução do XTT (2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[carbonilo(fenilamino)]-2H-tetrazólio-hidróxido) é reprodutível, sensível, rápido e está diretamente relacionado à atividade metabólica do biofilme. Em resumo, foram preparadas soluções-estoque de XTT (1 mg de sal/mL de PBS) e menadiona (1mM em etanol). Os biofilmes foram formados em placas diferentes para os diversos tempos: 0, 3, 12, 24, 48, 72 e 96 horas. Em seguida, 50 µL de solução de XTT + 4 uL de solução de menadiona foram adicionados aos poços das placas 96 poços e incubadas a 37°C por 3 horas. A atividade da desidrogenase mitocondrial fúngica reduz o sal de tetrazólio XTT a sais de formazana, resultando em alteração colorimétrica que se correlaciona com a viabilidade celular. A mudança colorimétrica foi medida utilizando um leitor de ELISA (*iMarkTM Microplate Reader; BIO-RAD*) na densidade óptica de 490nm. Em todos os experimentos, o meio RPMI 1640 isento da formação de biofilme foi incluído como controle negativo (Mowat *et al.*, 2007; Pitangui *et al.*, 2012).

3.8.3. Quantificação do biofilme

3.8.3.1. Quantificação da massa biofilme por coloração com cristal violeta

A quantificação dos biofilmes através da coloração por cristal violeta foi adaptada de acordo com o descrito por Mowat e colaboradores (2007). O biofilme foi formado em meios diferentes (RPMI 1640, BHI, DMEM e meio de queratinócitos) em placas de 96 poços (TPP®, *Trasadingen, Switzerland*). Após as 72 horas de formação, o meio de cultura foi retirado de cada poço e as células aderidas lavadas três vezes com PBS. Após a secagem em temperatura

ambiente, foram adicionados a cada poço, 100 µL de solução de cristal violeta a 0,5% por 5 minutos. Em seguida, os poços foram novamente lavados com água até que o excesso de coloração fosse removido e os biofilmes foram descorados pela adição de 100 µL de etanol a 95% em cada poço. O etanol foi então gentilmente homogeneizado com a pipeta até que o restante do cristal violeta fosse completamente solubilizado (aproximadamente 1 minuto). Por fim, as soluções de cada poço foram transferidas para uma nova placa de 96 poços, que foi lida em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 570 nm. Os valores da absorbância serão proporcionais à quantidade de biomassa do biofilme, compreendida por hifas e material extracelular (quanto maior a quantidade de material biológico, maior a coloração e o valor da absorbância).

3.8.3.2. *Quantificação da matriz extracelular pela coloração com safranina.*

As matrizes extracelulares produzidas pelos biofilmes foram quantificadas pela coloração com safranina, como descrito por Seidler, Salvenmoser & Muller (2008). Os biofilmes maduros formados com RPMI 1640, BHI, DMEM e meio de queratinócitos nas placas de 96 poços tiveram suas matrizes extracelulares coradas através da adição de 50 µL de solução de safranina a 1%, por 5 minutos. Em seguida, as placas foram lavadas cuidadosamente com a adição de 200 µL de solução salina estéril a 0,85%, até que os sobrenadantes ficassem límpidos. Por fim, as placas foram lidas no espectrofotômetro, no comprimento de onda de 492 nm.

3.8.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a MEV, o biofilme formado nas lamínulas em 4 meios diferentes, foi processado conforme descrito por Martinez e colaboradores (2010), com algumas modificações. Inicialmente, as amostras foram lavadas três vezes com PBS para remoção das células planctônicas e fixadas com 800 µL de solução de glutaraldeído (*Sigma-Aldrich*) a 2,5%, por 30

minutos a 4°C. Em seguida, foram realizadas três lavagens com água destilada estéril. As amostras foram então desidratadas com concentrações crescentes de álcool etílico, de 50% a etanol absoluto à temperatura ambiente. Por último, realizou-se a secagem em dessecador a vácuo. Antes da análise ao microscópio, as amostras foram montadas em cilindros de alumínio com prata (*stubs*) e colocadas em um evaporador de alto vácuo (*Denton Vacuum Desk V, Jeol USA*) para o revestimento de ouro. As características topográficas dos biofilmes foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-6610LV.

3.8.5. Microscopia confocal de varredura a laser

Para microscopia confocal foi preparada uma solução de CAAF (Concanavalina A – conjugada ao Alexa fluor 488 – *Molecular Probes*) e FUN 1 (*Molecular Probes, USA*). Essa mistura foi adicionada aos poços contendo os biofilmes formados nas lamínulas e as placas foram incubadas a 37°C, por 45 minutos, protegidas da luz. Em seguida, as lamínulas foram lavadas com água destilada, retiradas dos poços e vertidas sob 4 µL de *Fluoromount-G (Sigma-Aldrich)*, anteriormente depositado sobre lâminas de microscopia para observação em microscópio confocal *Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)* com programa de captura e processamento de imagem LAS AF 1.8.2 build 1465 *Leica Microsystems CMS Gmgh* (Martinez & Casadevall, 2006).

3.8.6. Efeito dos fármacos antifúngicos e dos derivados do ácido protocatecuico nas células planctônicas

Para a avaliação dos efeitos dos fármacos e dos compostos nas células planctônicas dos dermatófitos, os inóculos foram preparados na mesma concentração dos biofilmes, em meio RPMI 1640, de modo a atingir uma concentração final na placa de 96 poços correspondente a 1×10^6 UFC/mL e colocados em contato com as soluções-trabalho do derivado do ácido protocatecuico com melhor índice de seletividade (IS), fluconazol, terbinafina e griseofulvina,

nas seguintes concentrações: derivado do ácido protocatecuico: 250 – 0,005 mg/L; fluconazol e griseofulvina: 512-0,0625 mg/L; terbinafina: 32-0,001 mg/L. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 72 horas. Após esse período, a atividade metabólica foi quantificada através do ensaio de redução do XTT, como descrito no item 3.8.2. As análises dos resultados foram feitas conforme descrito por Martinez & Casadevall (2006), para as células de *Cryptococcus neoformans*.

3.8.7. Efeito dos fármacos antifúngicos e dos derivados do ácido protocatecuico frente aos biofilmes pré-formados

O teste de sensibilidade dos biofilmes foi realizado baseado no que foi descrito por Pierce e colaboradores (2008), com algumas modificações. Os biofilmes foram formados em placas de 96 poços, como descrito no item 3.8. Após a maturação, o meio de cultura foi cuidadosamente aspirado e o biofilme lavado por 3 vezes com 200 µL de solução salina estéril a 0,85% para a remoção das células planctônicas remanescentes nos poços. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas dos derivados do ácido protocatecuico e dos fármacos (fluconazol, terbinafina e griseofulvina) em meio RPMI-1640, nas mesmas concentrações descritas no item 3.8.6. Cem microlitros de cada diluição foram distribuídos nas placas de 96 poços, juntamente aos seus respectivos controles e as placas foram incubadas a 37°C por 72 horas. Para a verificação da atividade metabólica, foram preparadas soluções-estoque de XTT e menadiona como descrito no item 3.8.2. Cem microlitros dessa solução foram adicionados aos poços após o meio de cultura ser retirado e o biofilme lavado com solução salina estéril a 0,85%. As placas foram então incubadas a 37°C por 3 horas, protegidas da luz. Com a ajuda de uma pipeta multicanal, cerca de 80 µL foram removidos e transferidos para uma nova placa, lida em leitor de ELISA, na absorbância de 490 nm. A redução do crescimento foi então comparada ao controle de crescimento do biofilme, que corresponde a 100% de crescimento, livre de tratamento.

3.8.8. Comparação entre células planctônicas e em formato biofilme quanto à sensibilidade aos fármacos antifúngicos e compostos sintéticos.

Os efeitos dos compostos sintéticos e dos fármacos na prevenção da formação do biofilme e nos biofilmes maduros foram comparados através da determinação da porcentagem das atividades metabólicas das células planctônicas co-incubadas com os compostos e fármacos e das atividades metabólicas dos biofilmes maduros (Martinez & Casadevall, 2006; Nett *et al.*, 2008).

3.8.9. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biofilmes tratados

Para melhor visualização dos danos causados pelos compostos aos biofilmes, foi realizada a microscopia eletrônica de varredura. Os biofilmes foram formados em placas de 24 poços. Após a maturação, foram colocados em contato com as soluções trabalho dos fármacos e dos derivados do ácido protocatecuico, em concentrações baseadas nos resultados do item 3.8.8. Inicialmente, as amostras foram lavadas de duas a três vezes com solução salina estéril a 0,85% para remoção das células não aderentes e fixadas com 800 μ L de solução de glutaraldeído a 2,5% por 1 h em temperatura ambiente. As amostras foram novamente lavadas e desidratadas com concentrações crescentes de álcool etílico, de 50% a etanol absoluto em temperatura ambiente. Os fundos das placas foram cortados com a ajuda de um bisturi e, em seguida, foram secos em dessecador. Os fundos das placas foram fixados em fita de carbono, montados em cilindros de alumínio com prata (stubs) e colocados em um evaporador de alto vácuo para o revestimento de ouro e então, as características topográficas dos biofilmes foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (Martinez *et al.*, 2010).

3.8.10. Microscopia confocal de varredura a laser dos biofilmes maduros tratados com os fármacos e o composto derivado do ácido protocatecuico com melhor índice de seletividade

Para microscopia confocal, biofilmes foram formados em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares previamente esterilizadas. Após a maturação (72 h), o meio foi cuidadosamente aspirado e as soluções-trabalho nas mesmas concentrações utilizadas na MEV foram adicionadas aos poços (terbinafina – 32 mg/L; nonila – 256 mg/L). As placas foram incubadas por mais 72 h a 37°C e a preparação para a microscopia confocal foi realizada conforme descrito no item 3.5.8. As imagens foram feitas em microscópio confocal *Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)* e processadas no programa de captura e processamento de imagem LAS AF 1.8.2 build 1465 *Leica Microsystems CMS Gmgh* (Martinez & Casadevall, 2006; Costa-Orlandi, 2014).

3.9. ATIVIDADE *in vitro* DA COMBINAÇÃO ENTRE TERBINAFINA E O PROTOCATECUATO DE NONILA CONTRA *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*

A interação *in vitro* entre a terbinafina e o protocatecuato de nonila (o fármaco e o composto com melhor atividade anti-biofilme) foi verificada contra cepas ATCC de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* através do método do tabuleiro de xadrez. O inóculo e as soluções trabalho do fármaco e do composto foram preparados conforme descrito nos itens 3.5.1; 3.5.2 e 3.5.3 e de acordo com o que foi preconizado no documento M-38A2, proposto pelo CLSI (2008). Todos os testes foram conduzidos em placas de 96 poços e em meio RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, tamponado com MOPS. As concentrações finais testadas nas placas variaram de 0,5 a 0,002 mg/L para a terbinafina e de 8 a 0,25 mg/L para o protocatecuato de nonila. O inóculo foi preparado de modo a obter uma concentração final de 3×10^3 UFC/mL. Em seguida, as placas foram incubadas sem agitação à temperatura de 35°C por até 120 horas. Foram realizadas leituras visual e espectrofotométricas a 490 nm. A interação

foi classificada como sinérgica, indiferente (aditiva) ou antagonista, baseada nos valores do índice de concentração inibitória fracionada (ICIF). O ICIF corresponde à soma das concentrações inibitórias fracionadas (CIF) do fármaco e do composto testados. O CIF corresponde ao valor da CIM da combinação, dividido pelo valor de CIM do fármaco ou composto sozinho, como mostrado a seguir:

$$\mathbf{ICIF = CIF_{Terbinafina} + CIF_{Nonila}}$$

$$\mathbf{CIF_{Terbinafina} = CIM_{combinação} / CIM_{Terbinafina} \quad CIF_{Nonila} = CIM_{Combinação} / CIM_{Nonila}}$$

Valores de $ICIF \leq 0,5$ correspondem a uma interação sinérgica. Se os valores de ICIF forem $> 0,5$ e ≤ 4 , a interação é considerada indiferente (aditiva). Valores de $ICIF > 4$ a interação é considerada antagonista (Barchiesi, Falconi Di Francesco e Scalise, 1997; Johnson *et al.*, 2004; Santos & Hamdan, 2006; Chaturvedi *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2014).

3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para todos os testes foram realizados pelo menos três experimentos independentes, com exceção do item 3.9. Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando o teste t ou análise de variância com pós-teste de Bonferroni, através do software GraphPad Prism 5.0. Os valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

Resultados e Discussão

(Parte I)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

A confirmação da identificação morfofisiológica dos isolados clínicos de dermatófitos foi realizada através da análise da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*), que separa os genes 18S e 28S do RNA ribossomal. A região ITS do DNA consiste em sequências altamente conservadas interespecificamente, mas variável entre diferentes espécies, que permitem a identificação de relações filogenéticas além da distinção de espécies (Fungaro, 2000). Desta forma, a identificação molecular no presente trabalho, através da sequência de nucleotídeos da região ITS1-5.8S-ITS4 do rRNA, teve o objetivo de confirmar a identificação fenotípica dos isolados clínicos de dermatófitos feita previamente por Costa-Orlandi e colaboradores (2012). Os resultados mostram que a identificação molecular corroborou com a identificação morfofisiológica (**Tabela 1**).

A identificação dos dermatófitos através dos meios convencionais nem sempre é fácil e rápida, especialmente devido à capacidade de pleomorfismo desses fungos (Hryniewicz-Gwózdź *et al.*, 2011). Eckert e colaboradores (2015) identificaram espécies de dermatófitos a partir de 121 biópsias de 92 pacientes através de reações em cadeia da polimerase (PCR) com alvo na região ITS2 de dermatófitos, com subsequente sequenciamento. O sequenciamento detectou 94,3% de infecções por dermatófitos, comparado a 79,2% de infecções identificadas pelo método tradicional. Makimura e colaboradores (1998) analisaram as sequências de nucleotídeos das regiões ITS1 de dermatófitos e sugeriram que essas sequências de nucleotídeos são úteis não apenas para entender as relações filogenéticas, mas também para a identificação dos dermatófitos em nível de espécie. Rezaei-Matehkolaei e colaboradores (2016) mostraram que o sequenciamento da região ITS também é adequado para a identificação em nível de espécie e também para a análise filogeográfica do complexo *M. gypseum*. Giudice e

colaboradores (2012) realizaram o sequenciamento da região ITS do rDNA de isolados de *M. gypseum* e revelaram a presença de duas espécies teleomórficas de *M. gypseum*: *Arthroderma gypseum* e *A. incurvatum*. Gräser e colaboradores (1999; 2000; 2000) utilizaram técnicas de sequenciamento das regiões ITS, fingerprint de PCR e PCR-RFLP para definir estruturas precisas dos complexos de *T. mentagrophytes* e *T. tonsurans*, que foram identificados pelos métodos tradicionais. Através desse estudo, 24 espécies ou variedades dos complexos, foram reduzidas a apenas 5 espécies. As mesmas técnicas foram empregadas aos complexos *T. rubrum* e *M. canis*. Foi sugerido que 15 espécies ou variedades de *T. rubrum* poderiam ser reclassificadas como *T. rubrum* ou *T. violaceum*, assim como cinco espécies do complexo *M. canis* poderiam ser reclassificadas como *M. canis* (*Arthroderma otae*), *M. ferrugineum* e *M. audouinii* (Graser, Kuijpers, El Fari, *et al.*, 2000; Kanbe, 2008).

Tabela 1. Confirmação da identificação fenotípica dos isolados clínicos de dermatófitos, através do sequenciamento da região ITS.

Isolados/Cepas	ID Fenotípica	ID Genotípica (Após sequenciamento da região ITS)	Identidade (%)	Número de Acesso
Tr ATCC 28189	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i> genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA,ITS2, 28S rRNA	100%	AB305111.1
Tr 143	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i> genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA,ITS2, 28S rRNA	99%	AB305111.1
Tr 34	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i> 18S ribosomal RNA gene, ITS1, 5.8S ribosomal RNA gene	100%	JX431933.1
Tr 13	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; ITS1, 5.8S rRNA gene	100%	EF631619.1
Tr 65	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i> 5.8S rRNA gene, ITS1 and ITS2, strain IFM 45885	100%	AJ270805.1
Tr 69	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i> 18S ribosomal RNA gene, ITS1, 5.8S ribosomal RNA gene	100%	JX431933.1
Tr 70	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i> genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA,ITS2, 28S rRNA	99%	AB305111.1
Tm ATCC 11481	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i> 5.8 rRNA gene and ITS1 and ITS2 DNA (strain CBS 318.56)	100%	Z97995.1
Tm 66	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i> 5.8 rRNA gene and ITS1 and ITS2 DNA (strain CBS 106.67)	99%	Z98000.1
Mg ATCC 14683	<i>M. gypseum</i>	<i>M. gypseum</i> ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA gene, strain CCF 4626	100%	LN878968.1
Mg 180	<i>M. gypseum</i>	<i>M. gypseum</i> 5.8S rRNA gene, ITS1 and ITS2	100%	AJ970141.1
Mc ATCC 32903	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i> mRNA for 5.8S ribosomal RNA, strain ATCC MYA-4605	100%	AJ252329.1

Tr: *T. rubrum*; Tm: *T. mentagrophytes*; Mg: *M. gypseum*; Mc: *M. canis*

4.2. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DOS DERMATÓFITOS AOS ANTIFÚNGICOS E DERIVADOS DO ÁCIDO PROTOCATECUICO PELA TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

A atividade antifúngica de 13 derivados sintéticos do ácido protocatecuico foi determinada contra quatro cepas ATCC e oito isolados de dermatófitos. Também foram testados os fármacos fluconazol, griseofulvina, terbinafina, itraconazol, nistatina e miconazol. As cepas de *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6259 foram utilizadas como controle de qualidade dos testes (**Tabelas 2 e 3**). O protocatecuato de nonila foi o composto que melhor inibiu o crescimento fúngico na placa de microdiluição, seguido pela decila, com concentrações inibitórias mínimas variando entre 0,49 a 1,9 mg/L. Nonila teve um comportamento fungicida para a maioria dos fungos testados, com valores de concentração fungicida mínima correspondentes aos valores de CIM. Pentila e hexila apresentaram atividades inibitórias semelhantes, com as CIM's variando entre 1,9 a 15,6 mg/L para todos os fungos testados. Já o ácido protocatecuico, assim como os protocatecuatos de metila, etila e propila demonstraram atividade anti-dermatofítica fraca (CIM >62,6 – 31,2 mg/L), de acordo com Scorzoni e colaboradores (2007), apresentando, para a maioria das amostras, atividade fungicida. Butila apresentou melhor atividade antifúngica contra *M. gypseum* ATCC 14683, com um valor de CIM de 3,9 mg/L. Os protocatecuatos de dodecila, tetradecila, hexadecila e octadecila também apresentaram fraca atividade contra os dermatófitos testados, com valores de CIM entre 15,6 - >62,5 mg/L.

Com relação aos fármacos antifúngicos, observamos que *T. rubrum* ATCC 28189 e *M. gypseum* 180 foram resistentes ao fluconazol (CIM = 64 mg/L). *T. rubrum* ATCC 28189 também apresentou resistência ao itraconazol (CIM = 0,5 mg/L). *T. rubrum* 34 e *T. rubrum* 70 apresentaram-se resistentes ao itraconazol (CIM = 0,5 mg/L); o miconazol apresentou melhor

atividade contra a cepa ATCC 11481 de *T. mentagrophytes* (CIM = 0,125 mg/L), porém mostrou-se resistente quando testado contra o isolado clínico *T. rubrum* 143 (CIM > 16 mg/L). *T. mentagrophytes* 66 também se mostrou resistente ao itraconazol (CIM = 0,5 mg/L) e *M. gypseum* 180, além do fluconazol (CIM = 64 mg/L), também apresentou resistência à nistatina (CIM = 16 mg/L), como já descrito. Os valores de concentração inibitória mínima para os fármacos ficaram dentro do esperado e corroboraram com o que foi preconizado no documento M-38 A2. *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6259 tiveram um valor de MIC como esperado para fluconazol (1 e 64 mg/L) e itraconazol (0,12 e 0,25 mg/L), validando assim a qualidade do teste.

É importante ainda salientar que, além de ser o derivado mais potente, nonila também apresentou, no geral, valores de CIM menores que os fármacos fluconazol, nistatina e miconazol. Os resultados dos testes de sensibilidade dos compostos frente aos dermatófitos também mostraram a influência da cadeia carbônica na atividade anti-dermatofítica. A maioria dos resultados corroborou com o estudo anterior realizado em nosso laboratório por Soares e colaboradores (2014), com cepas de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*. Nele concluiu-se que, para essas linhagens, os ésteres mais potentes foram aqueles que possuíam uma quantidade de seis a nove carbonos na cadeia alquílica lateral. Nesse estudo foi verificado que a atividade antifúngica foi significativa nos ésteres que possuíam entre quatro e dez carbonos para todas as linhagens clínicas e ATCC dos dermatófitos testados. É sabido que o efeito antimicrobiano de compostos derivados de ácidos fenólicos aumenta com o acréscimo da cadeia alquílica lateral (Merkl *et al.*, 2010; Soares *et al.*, 2014). No entanto, observa-se que a adição de mais de 10 carbonos leva à redução da atividade antifúngica. Uma explicação plausível está no fato de que à medida que a cadeia carbônica cresce, sua lipossolubilidade é aumentada e o composto consegue atravessar a membrana plasmática e a parede celular fúngica, porém, após certo ponto, o composto fica tão lipossolúvel e tão grande, que não consegue realizar mais a travessia, diminuindo ou impedindo sua atividade. De acordo com Kubo, Fujita & Nihei (2003), a porção

hidrofílica do composto se conecta à porção hidrofílica da membrana, capacitando a porção hidrofóbica a entrar na bicamada lipídica, gerando uma desordem na membrana. Os mesmos protocatecuatos utilizados no presente trabalho foram testados quanto à sua atividade antioxidante por De Faria e colaboradores em 2012. A mesma relação estrutura-atividade foi observada, sendo assim, a cadeia carbônica apresenta um papel chave não só na atividade antifúngica, mas também na atividade antioxidante (Soares *et al.*, 2014).

Tabela 2. Valores da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM), expressos em mg/L para o ácido protocatecuico e seus derivados e fármacos antifúngicos contra espécies de *T. rubrum*.

Compostos / Fungos	<i>Tr*</i> ATCC 28189		<i>Tr*</i> 34		<i>Tr*</i> 65		<i>Tr*</i> 69		<i>Tr*</i> 70		<i>Tr*</i> 143		<i>Tr*</i> 13	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
Ácido Protocatecuico	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	> 62,5	> 62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5
Metila	31,2	31,2	>62,5	>62,5	62,5	62,5	31,2	31,2	62,5	>62,5	>62,5	>62,5	62,5	62,5
Etila	31,2	31,2	>62,5	>62,5	62,5	>62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5
Propila	31,2	31,2	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	31,2	31,2	31,2	31,2	62,5	62,5
Butila	7,8	7,8	15,6	15,6	15,6	15,6	7,8	7,8	7,8	62,5	7,8	7,8	15,6	15,6
Pentila	3,9	3,9	15,6	15,6	7,8	7,8	3,9	3,9	15,6	15,6	3,9	3,9	7,8	7,8
Hexila	3,9	3,9	15,6	15,6	7,8	15,6	3,9	3,9	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8
Nonila	0,97	0,97	1,9	1,9	1,9	1,9	0,49	0,49	1,9	1,9	3,9	3,9	3,9	3,9
Decila	3,9	3,9	7,8	7,8	7,8	7,8	3,9	3,9	15,6	15,6	7,8	7,8	7,8	7,8
Dodecila	> 62,5	> 62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	> 62,5	> 62,5	>62,5	>62,5	> 62,5	> 62,5	>62,5	>62,5
Tetradecila	> 62,5	> 62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	15,6	15,6	> 62,5	>62,5	15,6	15,6	> 62,5	>62,5
Hexadecila	> 62,5	> 62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	62,5	62,5	> 62,5	>62,5	62,5	62,5	> 62,5	>62,5
Octadecila	> 62,5	> 62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	> 62,5	> 62,5	>62,5	>62,5	> 62,5	> 62,5	>62,5	>62,5
Fluconazol	64	>64	32	>64	16	>64	8	32	32	>64	32	>64	32	>64
Griseofulvina	1	8	0,25	0,25	<0,125	<0,125	0,5	0,5	0,25	0,5	<0,125	<0,125	0,25	0,25
Terbinafina	0,03	0,03	0,125	0,125	0,06	0,06	0,015	0,015	0,06	0,06	0,125	0,125	0,06	0,06
Itraconazol	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,06	0,06	0,125	0,125
Nistatina	8	16	16	16	16	16	8	8	16	16	2	2	4	4
Miconazol	2	4	4	4	4	4	2	2	4	4	>16	>16	8	8

*Tr: *T. rubrum*

Tabela 3. Valores de CIM e CFM, expressos em mg/L para o ácido protocatecuico e seus derivados e fármacos contra espécies de *T. mentagrophytes*, *M. gypseum*, *M. canis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*.

Compostos / Fungos	<i>Tm</i> ** ATCC 11481		<i>Tm</i> ** 66		<i>Mg</i> *** ATCC 14683		<i>Mg</i> *** 180		<i>Mc</i> **** ATCC 32903		<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019		<i>C. krusei</i> ATCC 6259	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
Ácido Protoc.	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	-	-	-	-
Metila	62,5	62,5	62,5	62,5	31,2	31,2	31,2	31,2	62,5	62,5	-	-	-	-
Etila	62,5	62,5	62,5	62,5	31,2	31,2	31,2	31,2	62,5	62,5	-	-	-	-
Propila	31,2	62,5	62,5	62,5	31,2	31,2	31,2	31,2	62,5	62,5	-	-	-	-
Butila	7,8	7,8	15,6	31,2	3,9	3,9	7,8	7,8	7,8	7,8	-	-	-	-
Pentila	3,9	15,6	15,6	15,6	1,9	1,9	7,8	7,8	7,8	7,8	-	-	-	-
Hexila	3,9	15,6	7,8	7,8	1,9	1,9	7,8	15,6	3,9	3,9	-	-	-	-
Nonila	1,9-0,49	1,9	0,97	0,97	0,49	0,49	1,9	1,9	0,97	0,97	-	-	-	-
Decila	1,9	1,9	3,9	3,9	1,9	3,9	> 62,5	> 62,5	1,9	7,8	-	-	-	-
Dodecila	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6	62,5	> 62,5	> 62,5	15,6	> 62,5	-	-	-	-
Tetradecila	15,6	> 62,5	31,2	31,2	>62,5	>62,5	> 62,5	> 62,5	15,6	> 62,5	-	-	-	-
Hexadecila	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	31,2	>62,5	> 62,5	> 62,5	15,6	> 62,5	-	-	-	-
Octadecila	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	-	-	-	-
Fluconazol	1	4	4	32	8	32	64	>64	4	32	1	-	64	-
Griseofulvina	0,5	4	1	1	0,5	4	0,5	0,5	0,25	32	>64	-	>64	-
Terbinafina	0,0075	0,0075	0,03	0,03	0,06	0,06	0,25	0,25	0,125	0,125	>64	-	>64	-
Itraconazol	0,0075	0,03	0,5	0,5	0,125	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,12	-	0,25	-
Nistatina	2	2	8	8	16	16	16	16	16	16	1	-	4	-
Miconazol	0,125	0,125	1	8	0,5	0,5	4	4	0,25	2	>64	-	0,03	-

Tm*: *T. mentagrophytes*; *Mg*: *M. gypseum*; *****Mc*: *M. canis*

Os produtos naturais são a base para a maioria das terapias antimicrobianas utilizadas atualmente. Um exemplo disso são os polienos e as equinocandinas, que são antifúngicos potentes derivados de produtos naturais (Butts & Krysan, 2012). Nos últimos anos, nosso grupo tem trabalhado na descoberta de novos possíveis agentes antifúngicos a partir de compostos originados de produtos naturais. Além dos dermatófitos, os ácidos protocatecuicos mostraram-se potentes contra *Cryptococcus* spp; *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides* spp. (dados não publicados). De Paula e Silva e colaboradores (2014) testaram a atividade de quatorze derivados do ácido gálico contra diversas espécies de fungos patogênicos, entre eles, *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. neoformans*, *C. gattii*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *H. capsulatum*, *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. Contra os dois dermatófitos testados, os derivados que tiveram melhor atividade foram os galatos de octila, decila, undecila, dodecila e tetradecila. Para todas as espécies fúngicas testadas, o aumento da cadeia alquílica dos galatos, assim como ocorreu nos derivados do ácido protocatecuico, foi diretamente proporcional à sua atividade antifúngica. Além disso, Gullo e colaboradores (Gullo *et al.*, 2012) testaram a atividade antifúngica de dois metabólitos secundários (maitenina e prismaiterina), obtidos da planta *Maytenus ilicifolia*, popularmente conhecida no Brasil como espinheira santa. As melhores atividades foram obtidas pela maitenina, com valores de CIM e CFM variando entre 1,9 a 3,9 mg/L quando testadas contra *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*.

A literatura indica que nos últimos anos, a busca de compostos de origem natural com atividade anti-dermatofítica tem sido crescente. Entre os compostos descritos, destacam-se extratos hidroalcoólicos obtidos das folhas de *Rosmarinus officinalis* e *Tetradenia riparia* (Endo *et al.*, 2015); quitosana (Egusa *et al.*, 2015); óleos essenciais obtidos de *Litsea cubeba*, *Origanum majorana vulgare* e *Thymus serpyllum* (Nardoni *et al.*, 2015); derivados de chalconas (Gupta & Jain, 2015); *Lawsonia inermis* (henna) (Gozubuyuk, Aktas & Yigit, 2014); geraniol e citronelol (Pereira *et al.*, 2015), entre outros.

Os derivados alquílicos do ácido benzoico ou ácido protocatecuico, também chamados de 3,4 dihidroxibenzoatos têm sido reportados na literatura há vários anos por suas atividades biológicas e antioxidantes. Nihei, Nihei e Kubo (2003) relataram a atividade antifúngica do protocatecuato de nonila contra *Saccharomyces cerevisiae* (CIM = 12,5 mg/L). Além da atividade antifúngica, esse derivado também possui atividade bactericida contra *Staphylococcus aureus* resistente ou não à metilicina. O mesmo protocatecuato também se mostrou capaz de inibir o consumo de oxigênio e a enzima NADH oxidase de *Pseudomonas aeruginosa* (Kubo, Fujita & Nihei, 2003).

As recidivas nas infecções causadas pelos dermatófitos são frequentes, principalmente nas onicomicoses. Uma das razões da reincidência se deve à interrupção do tratamento longo que usualmente é necessário. No entanto, as recidivas também podem ocorrer devido à aquisição de resistência pelo fungo, principalmente em casos envolvendo tratamentos longos com baixas concentrações de fármacos (Ghelardi *et al.*, 2014).

O fluconazol é geralmente considerado um agente fungistático e tem boa atividade principalmente contra *Candida* spp (com exceção da *C. krusei*, que possui resistência intrínseca a esse fármaco) e *Cryptococcus* spp., porém, não possui boa atividade contra fungos filamentosos, com exceção dos dermatófitos (Clsi, 2008a; Sharma & Bhatia, 2011). A resistência dos dermatófitos ao fluconazol não é rara (Mendez-Tovar *et al.*, 2007; Santos & Hamdan, 2007), porém os mecanismos ainda são pouco entendidos, mas acredita-se que podem estar relacionados à bomba de efluxo e também à super expressão do gene ERG11, que aumenta a regulação da enzima lanosterol 14 α -demetilase (Mendez-Tovar *et al.*, 2007; Martinez-Rossi, Peres & Rossi, 2008; Hryncewicz-Gwozdz *et al.*, 2013).

Nenhum dos isolados clínicos apresentou-se resistente à terbinafina, porém a resistência à terbinafina, embora rara, é reportada na literatura (Mukherjee *et al.*, 2003; Osborne *et al.*, 2003). Esse fármaco inibe a enzima esqualeno epoxidase, bloqueando a síntese de esqualeno epóxido, resultando no acúmulo de níveis tóxicos de esqualeno e conseqüente diminuição dos níveis de produção de

ergosterol. A alta concentração intracelular de esqualeno pode interferir na função da membrana fúngica e também na síntese da parede celular.

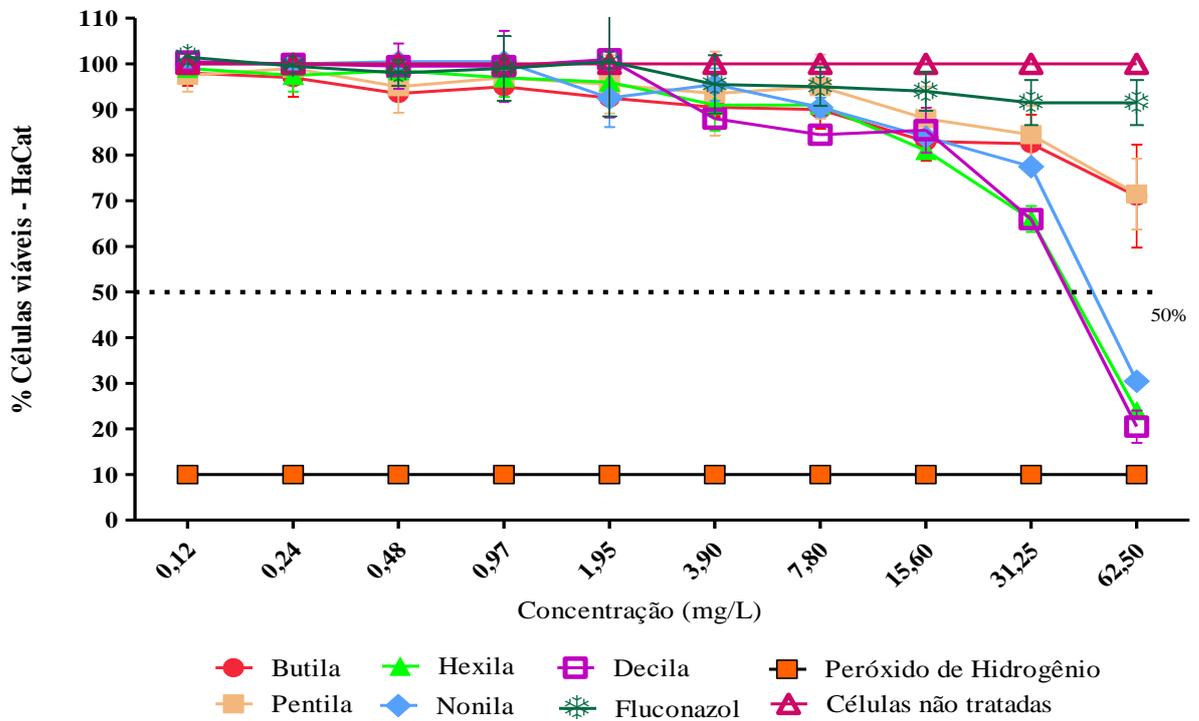
A resistência dos dermatófitos ao itraconazol também é rara, mas a resistência de isolados clínicos e de mutantes selecionados *in vitro* ao itraconazol é reportada (Mukherjee *et al.*, 2003; Khan e Ahmad, 2011; Hryncewicz-Gwozdz *et al.*, 2013; Ghelardi *et al.*, 2014).

4.3. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO DA SULFORODAMINA B

Os compostos com os menores valores de CIM (butila, pentila, hexila, nonila e decila) foram testados quanto à sua toxicidade em três linhagens celulares: HaCat (queratinócitos de pele humana imortalizados), NHOK (queratinócitos de mucosa oral humana) e HepG2 (células de hepatocarcinoma humano). Como controle de morte celular, foi utilizado peróxido de hidrogênio a 10%, considerando sua potência e a citotoxicidade foi avaliada utilizando como pontos de corte 50 e 80% de viabilidade celular.

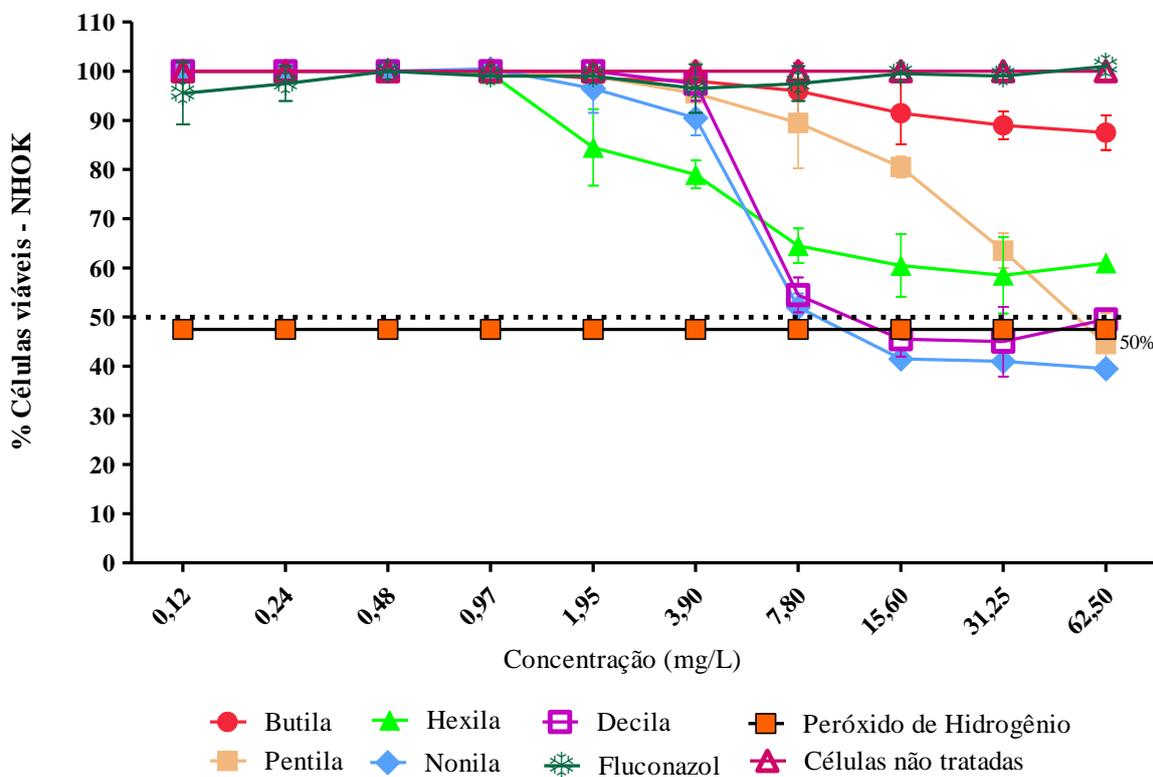
Nas linhagens de células HaCat, a viabilidade celular foi acima de 60% para todos os compostos nas concentrações compreendidas entre 0,12 – 31,2 mg/L (**Fig.6**). Na concentração correspondente a 62,5 mg/L, apenas os protocatecuatos de butila e pentila apresentaram viabilidade celular maior que 50%. Nas concentrações da CIM (0,49 a 15,6 mg/L), todos os compostos apresentaram viabilidade celular maior que 80%, sendo assim, nessa região, todos apresentaram baixa toxicidade para os queratinócitos de pele humana. Nas concentrações acima de 31,25 mg/L hexila, nonila e decila mostraram-se tóxicos. Ainda nessa linhagem celular, o peróxido de hidrogênio mostrou-se apropriado como controle de morte, apresentando uma viabilidade, em média, de apenas 10%.

Figura 6. Citotoxicidade dos compostos derivados do ácido protocatecuico em linhagens celulares HaCat (queratinócitos normais de pele humana).



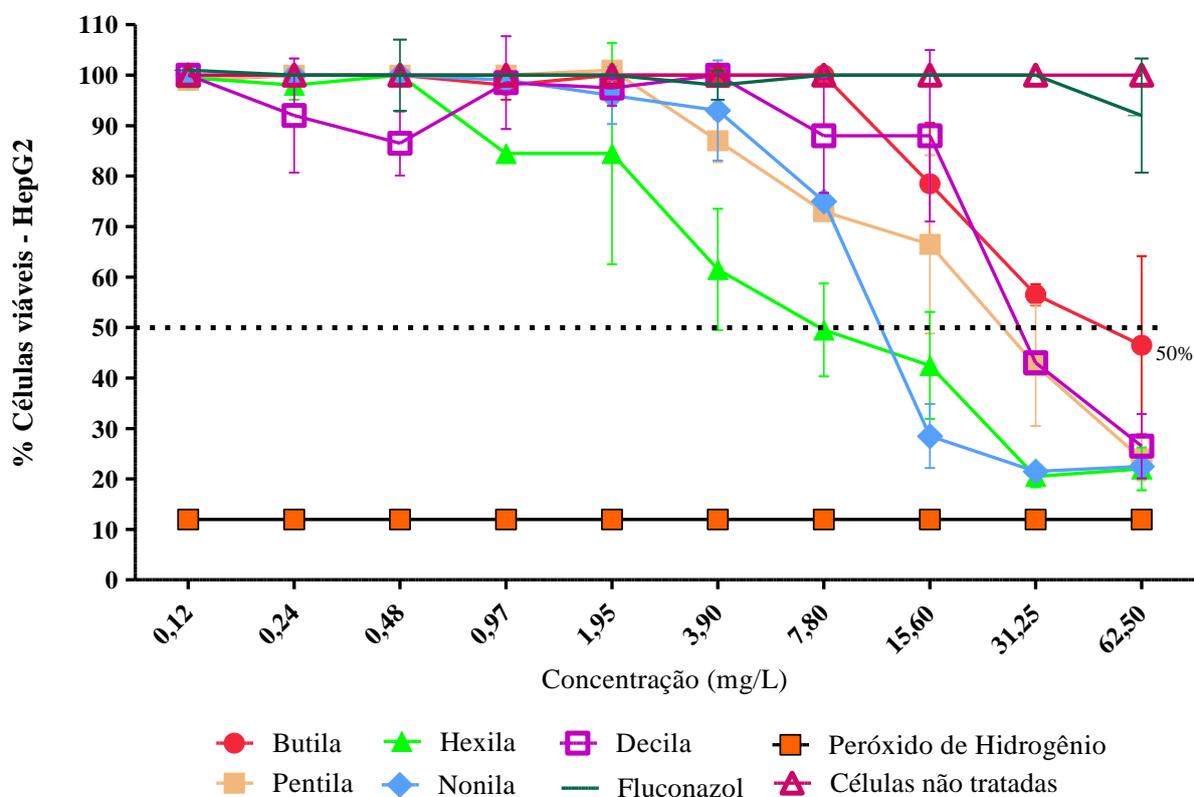
Para as células NHOK, butila, pentila e hexila apresentaram viabilidade maior ou igual a 50% em todas as concentrações testadas, portanto, esses compostos não apresentaram toxicidade para os queratinócitos de mucosa oral (**Fig.7**). Já nonila e decila apresentaram atividade citotóxica nas concentrações acima de 15,6 mg/L (40% de viabilidade). Contudo, nas concentrações correspondentes às regiões da CIM (0,49 a 15,6 mg/L), nenhum composto foi tóxico. O peróxido de hidrogênio não se apresentou como um bom controle de morte celular, resultando em uma média de viabilidade de aproximadamente 50% para os queratinócitos de mucosa oral humana.

Figura 7. Citotoxicidade dos compostos derivados do ácido protocatecuico em linhagens celulares NHOK (queratinócitos normais de mucosa oral humana). Butila, pentila e hexila não foram tóxicos, apresentando viabilidade celular $\geq 50\%$. Nonila e decila apresentaram toxicidade nas concentrações maiores que 15,6 mg/L.



Nas linhagens de hepatocarcinoma humano (HepG2), o composto menos tóxico foi o protocatecuato de butila, que, na maior concentração testada (62,5 mg/L), apresentou viabilidade celular de aproximadamente 50% (**Fig.8**). Nas regiões da CIM, considerando as margens de erro, todos os compostos tiveram viabilidade celular acima de 50%. Nas concentrações maiores que 15,6 mg/L, pentila, hexila, nonila e decila demonstraram ser tóxicos para as células tumorais. O peróxido de hidrogênio, assim como nas células HaCat, também se mostrou adequado como controle de morte, apresentando uma média de viabilidade celular em torno de 12%. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e de forma independente e os valores mais próximos foram considerados.

Figura 8. Citotoxicidade dos compostos derivados do ácido protocatecuico em linhagens celulares HepG2 (células de hepatocarcinoma humano).



O fluconazol foi utilizado como controle em todos os experimentos de citotoxicidade e, nas três linhagens celulares testadas, apresentou viabilidade acima de 90%.

Para todas as linhagens celulares, foi utilizado o método colorimétrico da sulforodamina B, pois esses derivados do ácido protocatecuico reagem com o MTT, produzindo resultados falso-positivos. O método de coloração com a sulforodamina B foi desenvolvido pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos e descrito por Skehan e colaboradores (1990), como uma alternativa à utilização do método de redução de MTT, no programa de triagem in vitro para a descoberta de novos agentes anti-neoplásicos (Escobar, Afonso & Aristizabal, 2009). É um método barato, sensível e rápido, que mede o conteúdo proteico de células aderentes e em suspensão.

Em seguida, foram calculados os valores do IC₅₀ e do índice de seletividade de cada composto para as três diferentes células. O IC₅₀ corresponde ao valor da concentração do composto que resulta em inibição de 50% da viabilidade celular e o índice de seletividade corresponde à razão do IC₅₀ pela concentração inibitória mínima (CIM). Os valores de IC₅₀ e o cálculo do índice de seletividade foram representados na **Tabela 4**. Nonila foi o composto com o melhor índice de seletividade nas células HaCat e HepG2 para a grande maioria das cepas. Já nas células NHOK, os compostos com os melhores IS entre as diversas cepas foram hexila e nonila.

As provas de citotoxicidade são essenciais para as fases iniciais de desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos, uma vez que definem a concentração a ser utilizada em etapas posteriores de avaliação. Além disso, evitam danos celulares e asseguram a seletividade dos microrganismos *in vitro* (Araújo *et al.*, 2008).

Na busca de novos compostos com propriedades antifúngica, a avaliação da citotoxicidade pelo método colorimétrico da sulforodamina B tem sido utilizada. Ishida e colaboradores (2006) verificaram a toxicidade do extrato de barbatimão, com atividade contra *Candida* spp, em células VERO, macrófagos murinos e células vermelhas do sangue. O barbatimão apresentou baixa toxicidade para todas as células testadas. Martins e colaboradores (2008), testaram a toxicidade em células VERO e pulmonares (V79), de enantiômeros de goniotalamina com atividade anti *Paracoccidioides*. Os compostos apresentaram mínima ou nenhuma toxicidade nas concentrações testadas. Matysiak (2005) testou a toxicidade de benzotiazinas com excelente atividade contra dermatófitos em células de câncer de mama, linhagem T47D. Os compostos apresentaram excelente atividade antitumoral. Nesse trabalho, os compostos com melhor atividade anti-dermatofítica foram também os que apresentaram maior toxicidade para as células de hepatocarcinoma humano.

Tabela 4. Representação do IC₅₀ e IS em células HaCat, NHOK e HeG2 dos compostos butila, pentila, hexila, nonila e decila.

		IS (IC ₅₀ /CIM)													
	Compostos	IC ₅₀ (mg/L)	Tm ATCC 11481	Tm 66	Mg ATCC 14683	Mg 180	Mc ATCC 32903	Tr ATCC 28189	Tr 34	Tr 65	Tr 69	Tr 70	Tr 143	Tr 13	
HaCat	Butila	> 62,5	> 8	> 4	> 16	> 8	> 8	> 8	> 4	> 4	> 8	> 8	>8	>4	
	Pentila	> 62,5	> 16	> 4	> 33	> 8	> 8	> 16	> 4	> 8	> 16	> 4	>16	>8	
	Hexila	62,5	16	8	33	8	16	16	4	8	16	8	8	8	
	Nonila	62,5	128	64	128	33	64	64	64	33	33	128	33	16	16
	Decila	62,5	33	16	33	< 1	33	16	8	8	16	4	8	8	
		IS (IC ₅₀ /CIM)													
	Compostos	IC ₅₀ (mg/L)	Tm ATCC 11481	Tm 66	Mg ATCC 14683	Mg 180	Mc ATCC 32903	Tr ATCC 28189	Tr 34	Tr 65	Tr 69	Tr 70	Tr 143	Tr 13	
NOHK	Butila	> 62,5	> 8	> 4	> 16	> 8	> 8	> 8	> 4	> 4	> 8	> 8	>8	>4	
	Pentila	62,5	16	4	33	8	8	16	4	8	16	4	16	8	
	Hexila	> 62,5	> 16	8	33	> 8	> 16	> 16	> 4	> 8	> 16	> 8	>8	> 8	
	Nonila	15,6	32	16	32	8	16	16	8	8	32	8	4	4	
	Decila	15,6	8	4	8	< 0,2	8	4	2	2	4	1	2	2	
		IS (IC ₅₀ /CIM)													
	Compostos	IC ₅₀ (mg/L)	Tm ATCC 11481	Tm 66	Mg ATCC 14683	Mg 180	Mc ATCC 32903	Tr ATCC 28189	Tr 34	Tr 65	Tr 69	Tr 70	Tr 143	Tr 13	
HepG ₂	Butila	62,5	8	4	16	8	8	8	4	4	8	8	8	4	
	Pentila	31,25	8	2	16	4	4	8	2	4	8	2	8	4	
	Hexila	7,8	2	1	4	1	2	2	0,5	1	2	1	1	1	
	Nonila	15,6	32	16	32	8	16	16	8	8	32	8	4	4	
	Decila	31,25	16	8	16	< 0,5	16	8	4	4	8	2	4	4	

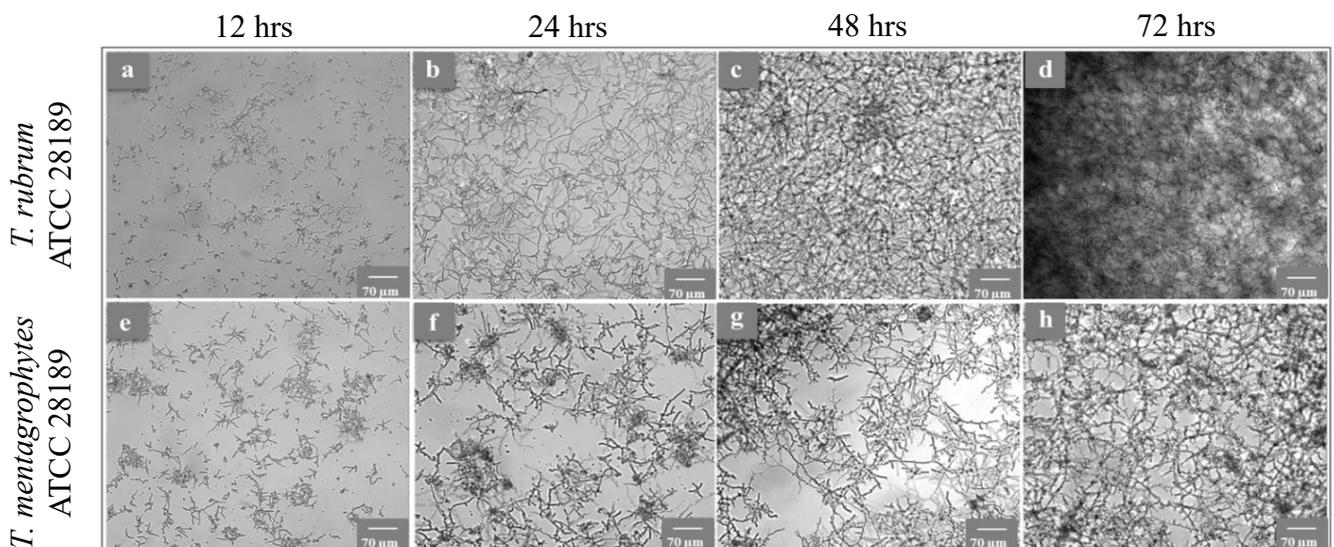
Tr: *T. rubrum*; Tm: *T. mentagrophytes*; Mg: *M. gypseum*; Mc: *M. canis*; CIM: concentração inibitória mínima; IS: índice de seletividade; IC₅₀: concentração onde ocorre 50% de inibição da atividade celular

4.4. ENSAIO DE FORMAÇÃO DO BIOFILME

4.4.1. Análise morfológica dos biofilmes

O desenvolvimento dos biofilmes das cepas *T. rubrum* ATCC 28189 e *T. mentagrophytes* ATCC 11481 foi avaliado por meio de microscopia óptica, em diferentes intervalos de tempo, utilizando o equipamento *In Cell Analyser 2000 (GE healthcare)*. A **Fig. 9** mostra que ambas as espécies foram capazes de aderir ao fundo das microplacas de poliestireno e formar biofilmes em meio RPMI 1640. Nesta figura, a,b,c e d representam o biofilme de *T. rubrum* ATCC 28189 após 12, 24, 48 e 72 horas, enquanto e, f, g e h, representam o mesmo período de desenvolvimento do biofilme de *T. mentagrophytes* ATCC 11481. Uma massa mais densa e compacta foi observada na cepa referência de *T. rubrum* após 72 horas de incubação (**Fig. 9d**).

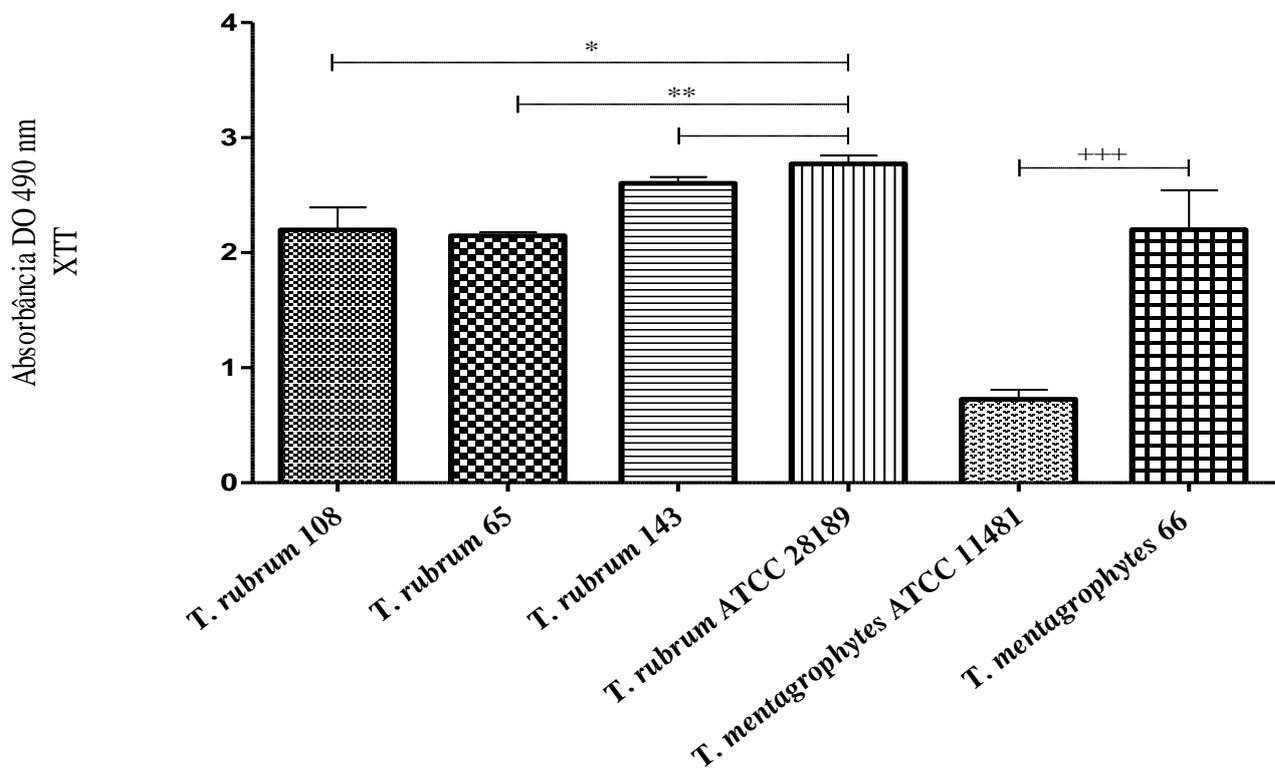
Figura 9. Análise morfológica dos biofilmes de *T. mentagrophytes* ATCC 11481 e *T. rubrum* ATCC 28189 no equipamento *In Cell Analyser (GE Healthcare)*. a= Morfologia do biofilme de *T. rubrum* após 12h; b= Morfologia do biofilme de *T. rubrum* após 24 h; c= Morfologia do biofilme de *T. rubrum* após 48h; d= Biofilme de *T. rubrum* após 72h; e= Morfologia do biofilme de *T. mentagrophytes* após 12h; f= Morfologia do biofilme de *T. mentagrophytes* após 24h; g= Morfologia do biofilme de *T. mentagrophytes* após 48h; h= Biofilme de *T. mentagrophytes* após 72h.



4.4.2. Determinação da atividade metabólica do biofilme pelo ensaio de redução do XTT

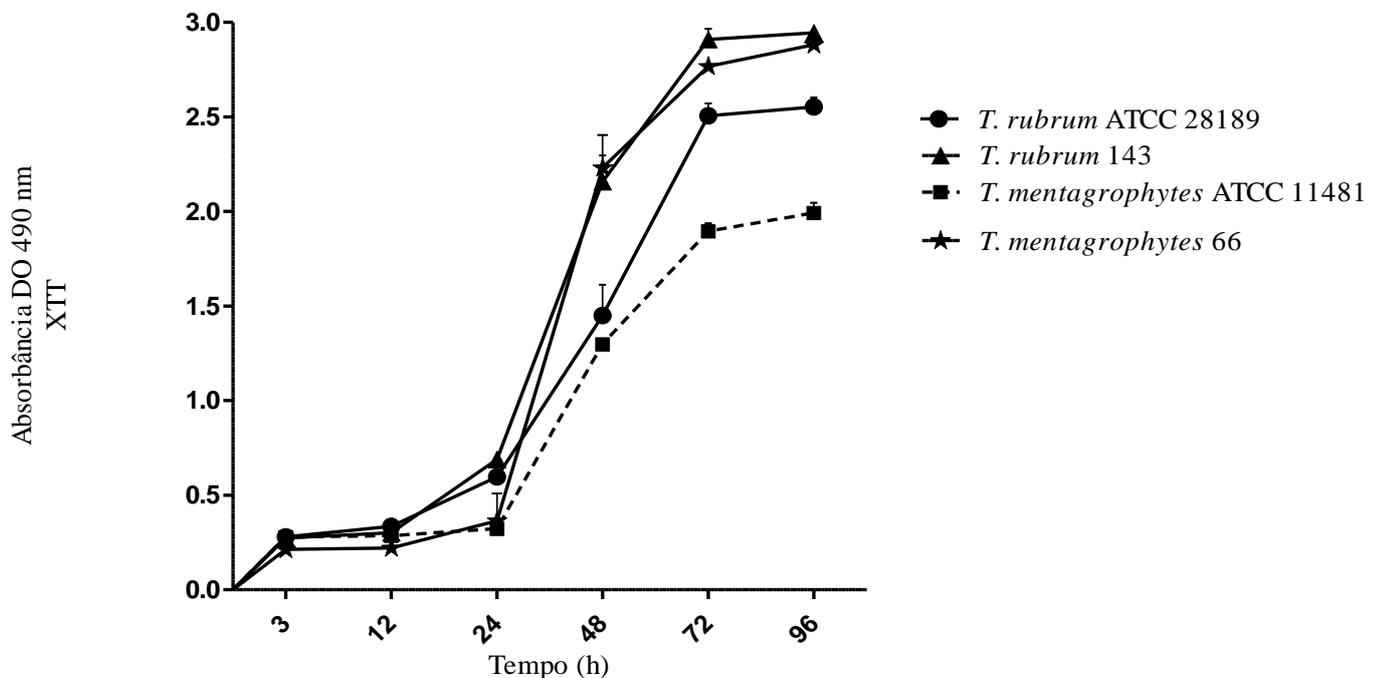
Os resultados das atividades metabólicas dos biofilmes maduros das quatro cepas clínicas e das duas ATCC estão dispostos na **Fig. 10**. Todas as cepas foram capazes de formar biofilmes. Observa-se que os biofilmes maduros de *T. rubrum* 65 e *T. rubrum* 108, formados em meio RPMI, tiveram atividade metabólica inferior quando comparadas a *T. rubrum* ATCC 28189 ($p < 0,01$ e $p < 0,05$). Para *T. rubrum* 143, não houve significância estatística quando comparada à mesma referência. O biofilme maduro da cepa clínica de *T. mentagrophytes* (Tm 66) teve atividade metabólica superior a *T. mentagrophytes* ATCC 11481 ($p < 0,001$) e *T. rubrum* 28189 ($p < 0,05$). Para as demais não houve significância.

Figura 10. Comparação entre as atividades metabólicas dos biofilmes maduros formados em meio RPMI 1640, de cepas clínicas e ATCC de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$.



As curvas de crescimento dos biofilmes foram realizadas com os dois isolados clínicos de cada espécie que apresentaram melhor atividade metabólica no item anterior (*T. rubrum* 143 e *T. mentagrophytes* 66) e as duas cepas de referência (*T. rubrum* ATCC 28189 e *T. mentagrophytes* 11481). Os resultados indicam que as atividades metabólicas iniciais dos biofilmes ocorreram após 3 horas de incubação. No período compreendido entre 12 a 24 horas, observou-se um ligeiro aumento e, após 48 horas, verificou-se um aumento significativo. Após as 72 horas, as células começaram a se destacar da superfície de poliestireno e, com isso, as atividades metabólicas tenderam a atingir um *plateau*, sendo assim, o período de 72 horas foi considerado o tempo ideal para a maturação dos biofilmes. Todas as cepas obtiveram resultados semelhantes e, no geral, nenhuma significância estatística foi observada ($p>0.05$) (**Fig. 11**).

Figura 11. Cinética da formação de biofilme em *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* em microplacas de 96 poços. Na análise geral, as quatro cepas mostraram resultados semelhantes. Nenhuma diferença significativa foi observada ($p>0,05$).



Os ensaios colorimétricos são ferramentas importantes para o estudo da viabilidade de células eucarióticas. O XTT é um sal de tetrazólio amarelo que, na presença de atividade metabólica, é convertido a sais de formazana de coloração laranja, solúveis em água e facilmente medidos nos sobrenadantes celulares. Isso faz com que essa técnica seja importante no estudo dos biofilmes, sem o envolvimento na estrutura das comunidades celulares, permitindo o estudo dos biofilmes intactos (Jin *et al.*, 2003; Kuhn *et al.*, 2003). Muitos autores afirmam que a mudança colorimétrica do sal de tetrazólio é proporcional ao número de células vivas, no entanto, Kuhn e colaboradores (2003), descreveram algumas limitações para o uso do XTT nos estudos de crescimento e metabolismo dos biofilmes de *C. albicans* e *C. parapsilosis*. De acordo com eles, não se pode afirmar que exista necessariamente uma relação linear entre o número de células do microrganismo e o sinal colorimétrico. Além disso, os autores afirmam que diferentes cepas ou isolados clínicos podem ser capazes de reter intracelularmente os sais de formazana em quantidades maiores ou menores, causando alterações nas leituras das atividades metabólicas. Jin e colaboradores (2003) ao contrário, confirmaram a linearidade entre o número de células e a atividade celular medida pelo ensaio de redução do XTT. No entanto, é preciso considerar a presença da matriz extracelular envolvendo o biofilme, que pode limitar o acesso de nutrientes e oxigênio às células, podendo possivelmente causar alterações metabólicas (Henriques, Azeredo & Oliveira, 2006). Diante desse contexto, é preciso utilizar diferentes métodos na caracterização dos biofilmes.

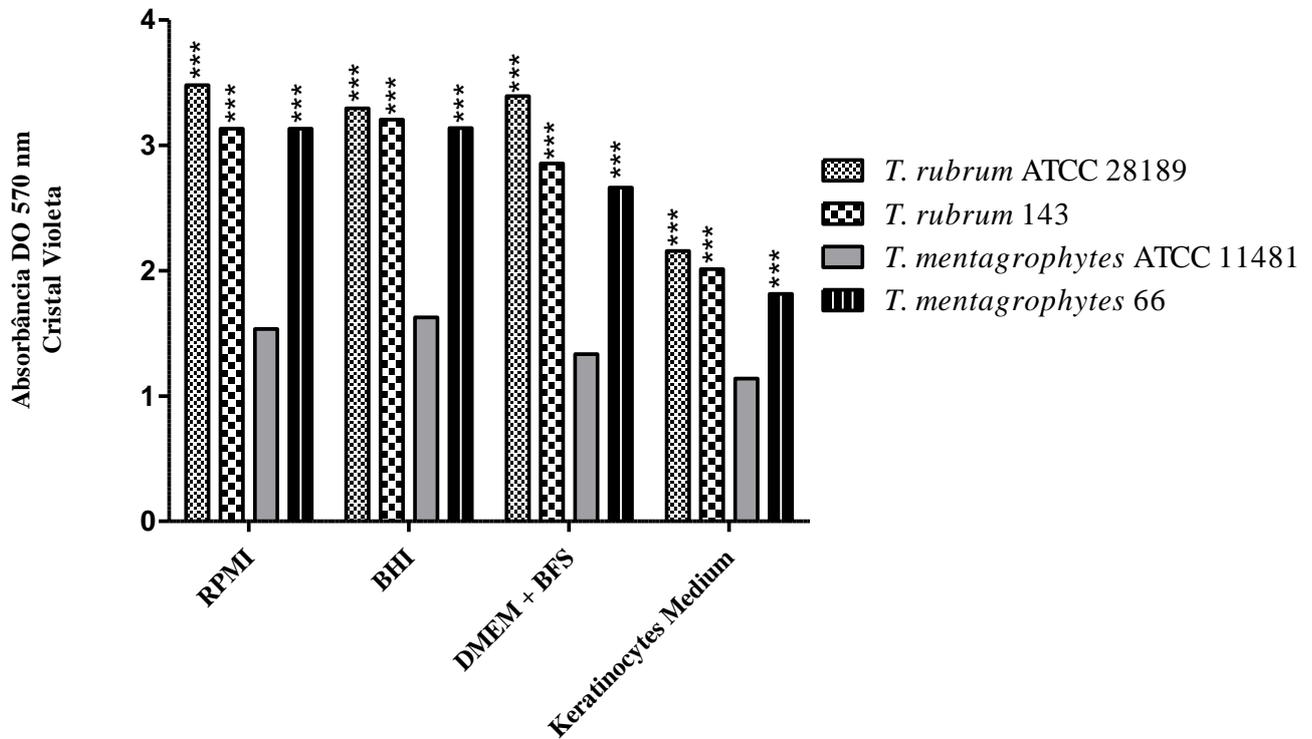
Apesar disso, o ensaio de redução do XTT ainda é amplamente utilizado no estudo do desenvolvimento dos biofilmes das diversas espécies fúngicas e bacterianas, nos testes de sensibilidade e na verificação da resistência aos fármacos (Ramage *et al.*, 2001; Martinez & Casadevall, 2006; Mowat *et al.*, 2007; Peeters, Nelis & Coenye, 2008; Pierce *et al.*, 2008; Seidler, Salvenmoser & Muller, 2008; Martinez *et al.*, 2010; Pires, Montanari, *et al.*, 2011; Pitangui *et al.*, 2012; Sardi *et al.*, 2015).

4.4.3. Quantificação do biofilme

4.4.3.1. Quantificação da massa do biofilme por coloração com cristal violeta

Os resultados da quantificação das biomassas mostraram que na análise geral, todos os meios testados foram bons para o desenvolvimento da biomassa. *T. mentagrophytes* ATCC 11481 foi a cepa que produziu menor quantidade de biomassa quando comparada a *T. rubrum* ATCC 28189, *T. rubrum* 143 e *T. mentagrophytes* 66, nos quatro meios testados ($p < 0.001$) (**Fig. 12**).

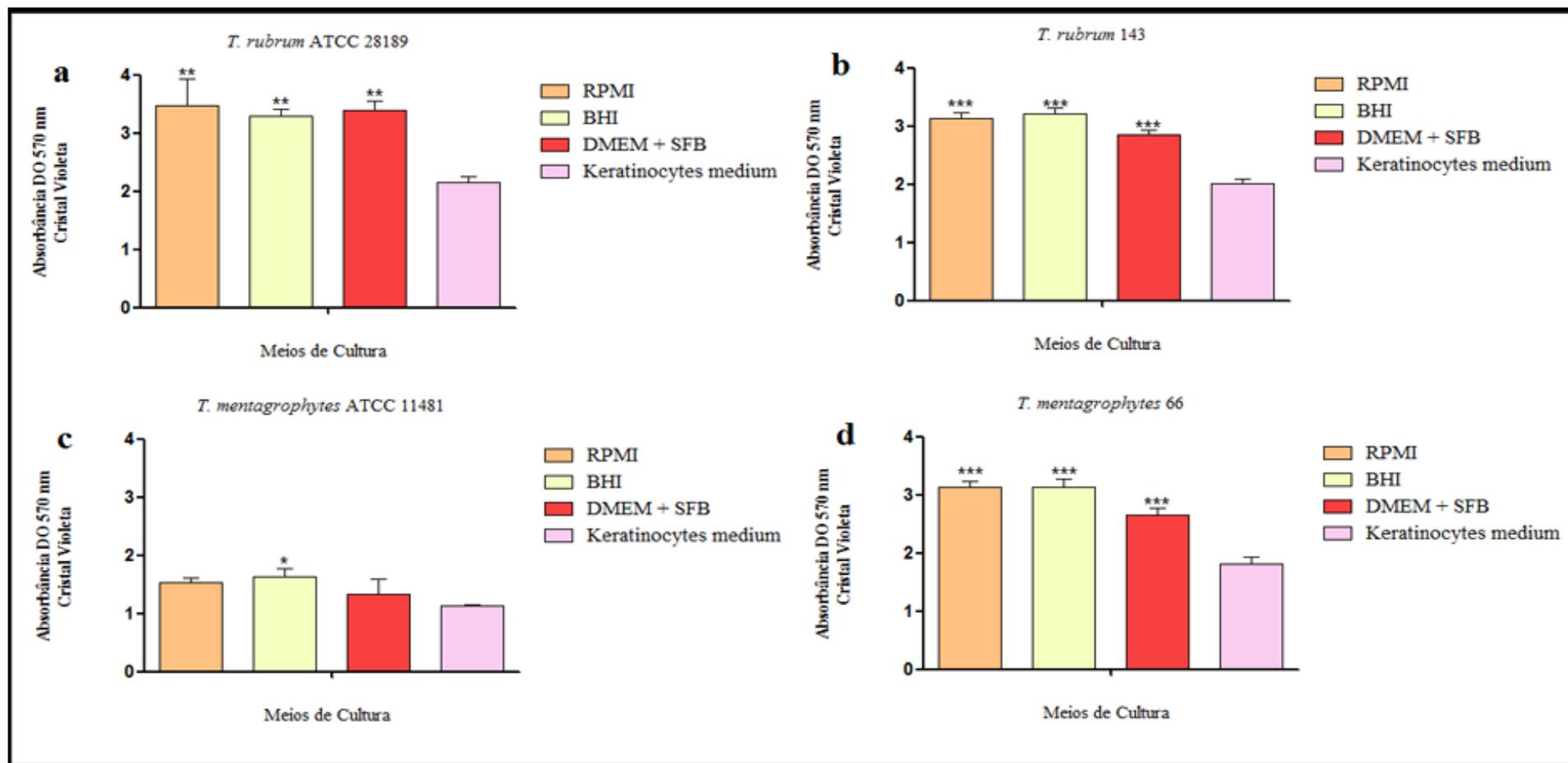
Figura 12. Quantificação da biomassa pela coloração com cristal violeta. Nos quatro meios diferentes, *T. mentagrophytes* ATCC 11481 produziu menos biomassa que *T. rubrum* ATCC 28189, *T. rubrum* 143 e *T. mentagrophytes* 66. *** $p < 0.001$



A influência dos meios foi também verificada individualmente para cada cepa. Observa-se na **Fig. 13** que para as três cepas (*T. rubrum* ATCC 28189, *T. rubrum* 143 e *T. mentagrophytes* 66), os meios RPMI 1640, BHI e DMEM foram ótimos para a produção de biomassa quando comparados ao meio de queratinócitos ($p < 0,05$). Para a cepa de *T. mentagrophytes* 11481, o meio que melhor estimulou a produção de biomassa foi o BHI quando comparado ao meio de queratinócitos ($p < 0,05$). Ainda para essa última cepa, não há significância estatística na comparação entre os meios RPMI, DMEM e meio de queratinócitos. As análises mostraram que, para a maioria das cepas, os meios que melhor estimularam a produção de biomassa em *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* foram RPMI 1640, BHI e DMEM.

O cristal violeta foi descrito primeiramente por Christensen e colaboradores (1985) e, desde então tem sido modificado para permitir a quantificação de toda a massa do biofilme dentro dos poços das microplacas (Stepanovic *et al.*, 2000; Mowat *et al.*, 2007). O cristal violeta é um corante básico, que se liga às moléculas carregadas negativamente da superfície do biofilme e aos polissacarídeos da matriz extracelular. Tanto as células vivas quanto as mortas são coradas e, devido a isso, essa coloração não é indicada para a avaliação da viabilidade celular e sim para a quantificação da massa total do biofilme microbiano e para dosar a concentração celular (Jin *et al.*, 2003; Peeters, Nelis & Coenye, 2008). Essa técnica é amplamente empregada na quantificação da massa dos biofilmes fúngicos (Henriques, Azeredo & Oliveira, 2006; Martinez & Casadevall, 2006; Mowat *et al.*, 2007; Marcos-Zambrano *et al.*, 2016; Vandecandelaere, Van Acker & Coenye, 2016).

Figura 13. Influência de RPMI, BHI, DMEM e meio de queratinócitos na produção de biomassa nos biofilmes de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*. Para *T. rubrum* ATCC 28189, *T. rubrum* 143 e *T. mentagrophytes* 66, os meios RPMI, BHI e DMEM foram ótimos para a produção de biomassa quando comparados ao meio de queratinócitos. Para *T. mentagrophytes* ATCC 11481, o meio que melhor estimulou a produção de biomassa quando comparado ao meio de queratinócitos, foi o caldo BHI.

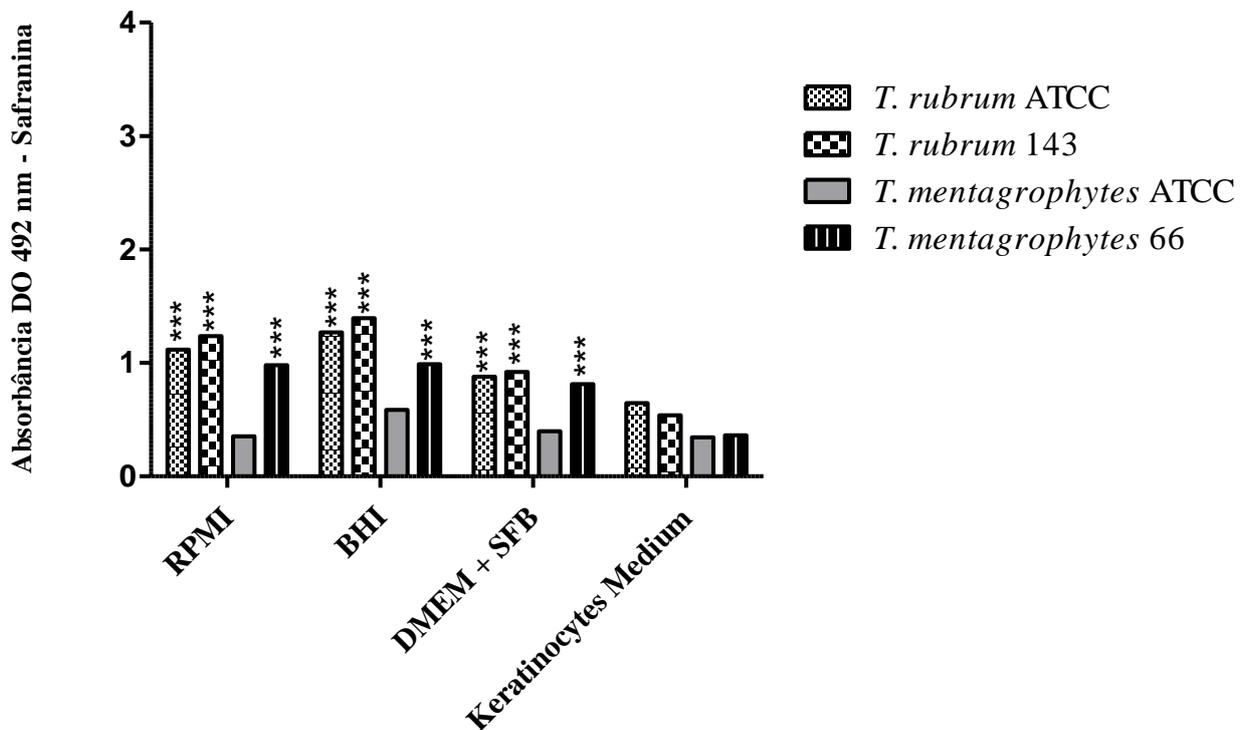


* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.4.3.2. Quantificação da matriz extracelular e estruturas polissacarídicas pela coloração com safranina.

As estruturas polissacarídicas e as matrizes extracelulares produzidas pelos biofilmes em RPMI 1640, BHI, DMEM e meio de queratinócitos foram quantificadas pela coloração com safranina. Os resultados mostram que nos meios RPMI, BHI e DMEM com soro fetal bovino (SFB), a cepa e o isolado clínico de *T. rubrum* e o isolado clínico de *T. mentagrophytes* produziram mais material polissacarídico que *T. mentagrophytes* ATCC 11481 ($p < 0,001$) (**Fig. 14**). No meio de queratinócitos, todas as cepas e isolados clínicos produziram matrizes extracelulares em quantidades estatisticamente equivalentes ($p > 0,05$) e inferiores aos demais meios.

Figura 14. Quantificação da matriz extracelular e estruturas polissacarídicas pela coloração com safranina.

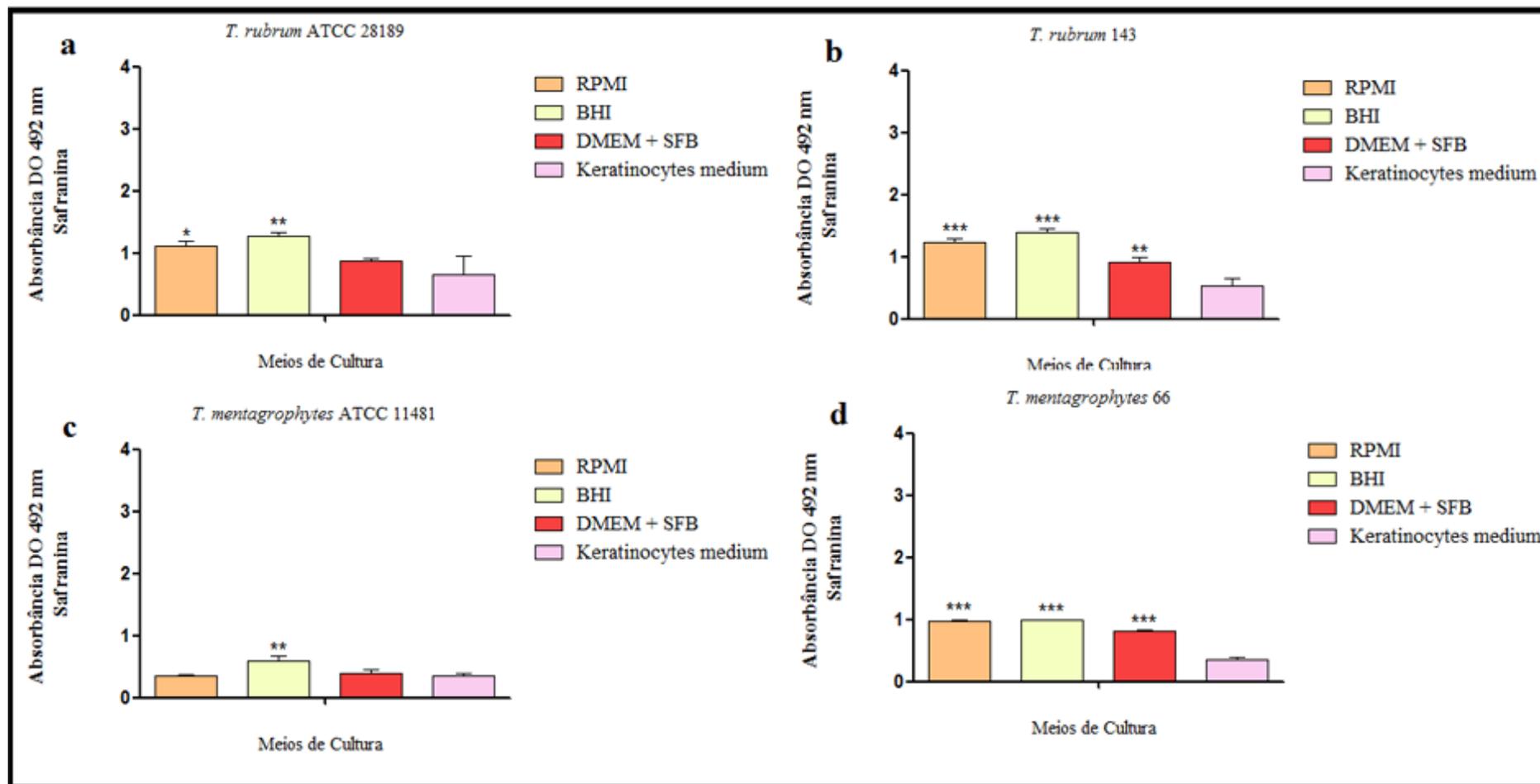


A influência do meio de cultura na produção de matriz por cada cepa também foi verificada (**Fig. 15**). Nos biofilmes de *T. rubrum* ATCC 28189, os meios que mais estimularam a produção de matriz foram RPMI 1640 e o caldo BHI, quando comparados ao meio de queratinócitos ($p < 0,05$ e $p < 0,01$) (**Fig. 15a**). Para o isolado clínico de *T. rubrum*, além dos meios anteriores, DMEM foi maior estimulador da produção de material polissacarídico que o meio de queratinócitos ($p < 0,01$) (**Fig. 15b**). O mesmo comportamento foi observado na cepa clínica de *T. mentagrophytes* (**Fig. 15c**). Por fim, para *T. mentagrophytes* ATCC 11481, a maior quantidade de matriz foi produzida no biofilme formado em caldo BHI ($p < 0,05$) (**Fig. 15d**).

A habilidade da safranina de corar as estruturas polissacarídicas fúngicas e a matriz extracelular foi reportada por Seidler e colaboradores (2006; 2008), em biofilmes de *Candida* e *A. fumigatus* e, desde então, essa técnica tem sido empregada no estudo da matriz produzida nos biofilmes fúngicos (Simitsopoulou *et al.*, 2013).

A matriz extracelular dos biofilmes é um arranjo altamente complexo de microambientes. Os diferentes componentes dentro do biofilme, como água, polissacarídeos e outras macromoléculas, oferecem uma gama de efeitos localizados e em constante mudança que geram gradientes osmóticos e de nutrientes. Em qualquer biofilme, essas características contribuirão para a composição heterogênea da matriz e também para a sua função multicelular (Sutherland, 2001).

Figura 15. Influência de RPMI, BHI, DMEM e meio de queratinócitos na produção de matriz extracelular e estruturas polissacarídicas nos biofilmes de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*. Para *T. rubrum* ATCC 28189, os meios que melhor estimularam a produção de matriz extracelular foram RPMI e BHI quando comparados ao meio de queratinócitos. Para *T. rubrum* 143 e *T. mentagrophytes* 66, além dos meios RPMI e BHI, DMEM também foi bom estimulador da produção de matriz. Já para *T. mentagrophytes* ATCC 11481, o caldo BHI foi o melhor meio para a estimulação da produção de estruturas polissacarídicas quando comparado ao meio de queratinócitos.



* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.4.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A topografia dos biofilmes maduros de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* formados em meio RPMI, BHI e DMEM foi observada através de microscopia eletrônica de varredura. Para todas as cepas, notou-se a formação de biofilmes na presença de uma matriz extracelular altamente organizada, às vezes densa, às vezes fina, cobrindo e interligando as hifas em várias partes dos biofilmes. A **figura 16** representa o biofilme maduro de *T. rubrum* ATCC 28189 formado no meio RPMI. Observou-se uma biomassa compacta, formada por hifas cobertas em alguns pontos por grande quantidade de uma matriz extracelular densa, dando muitas vezes, um aspecto enrugado à hifa (**B**, **C** e **D**). O mesmo pôde ser visto nos biofilmes de *T. rubrum* ATCC 28189 formados nos meios BHI (**Fig. 17**) e DMEM (**Fig. 18**). Para essa cepa, os resultados da MEV foram concordantes com os resultados anteriores no que diz respeito à biomassa e à produção de matriz extracelular. Os três meios foram ótimos para a formação de biofilme por essa cepa, produzindo uma biomassa compacta e satisfatória e material polissacarídeo em quantidade razoável.

Figura 16. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do biofilme maduro de *T. rubrum* ATCC 28189 formado em meio RPMI. As setas apontam a matriz extracelular densa, dando um aspecto enrugado às hifas.

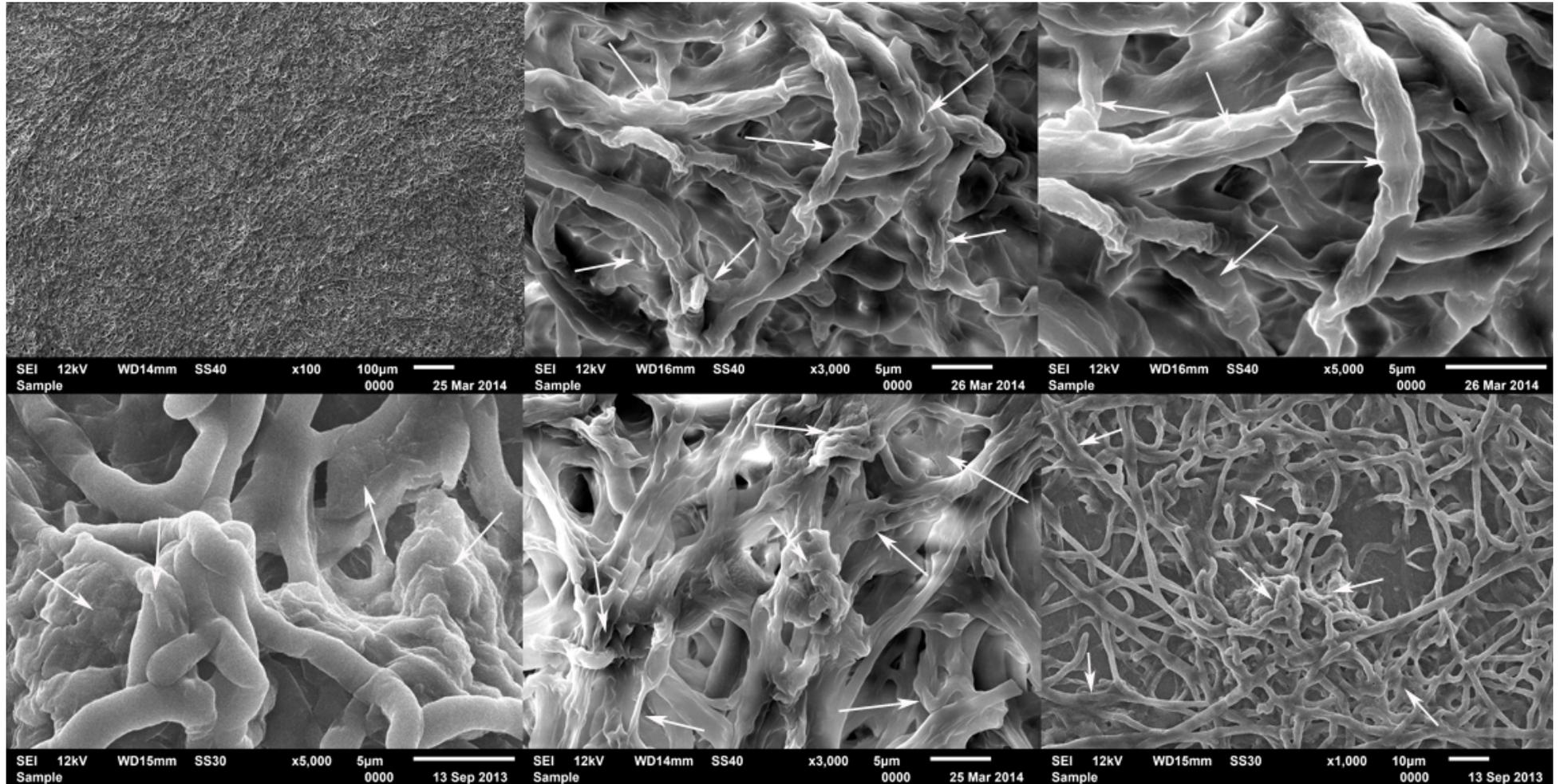


Figura 17. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro de *T. rubrum* ATCC 28189 formado em meio BHI. As setas apontam a matriz extracelular.

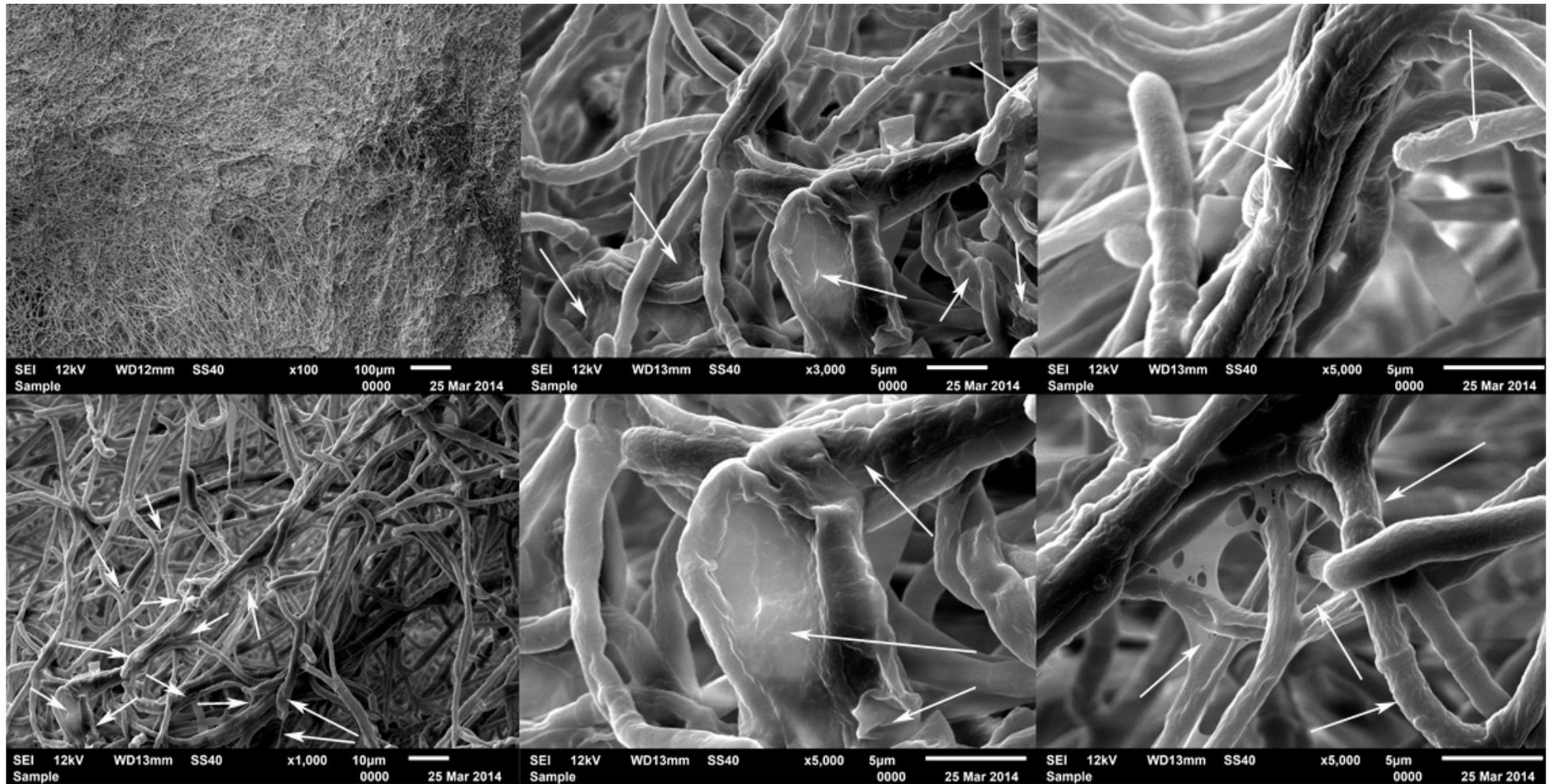
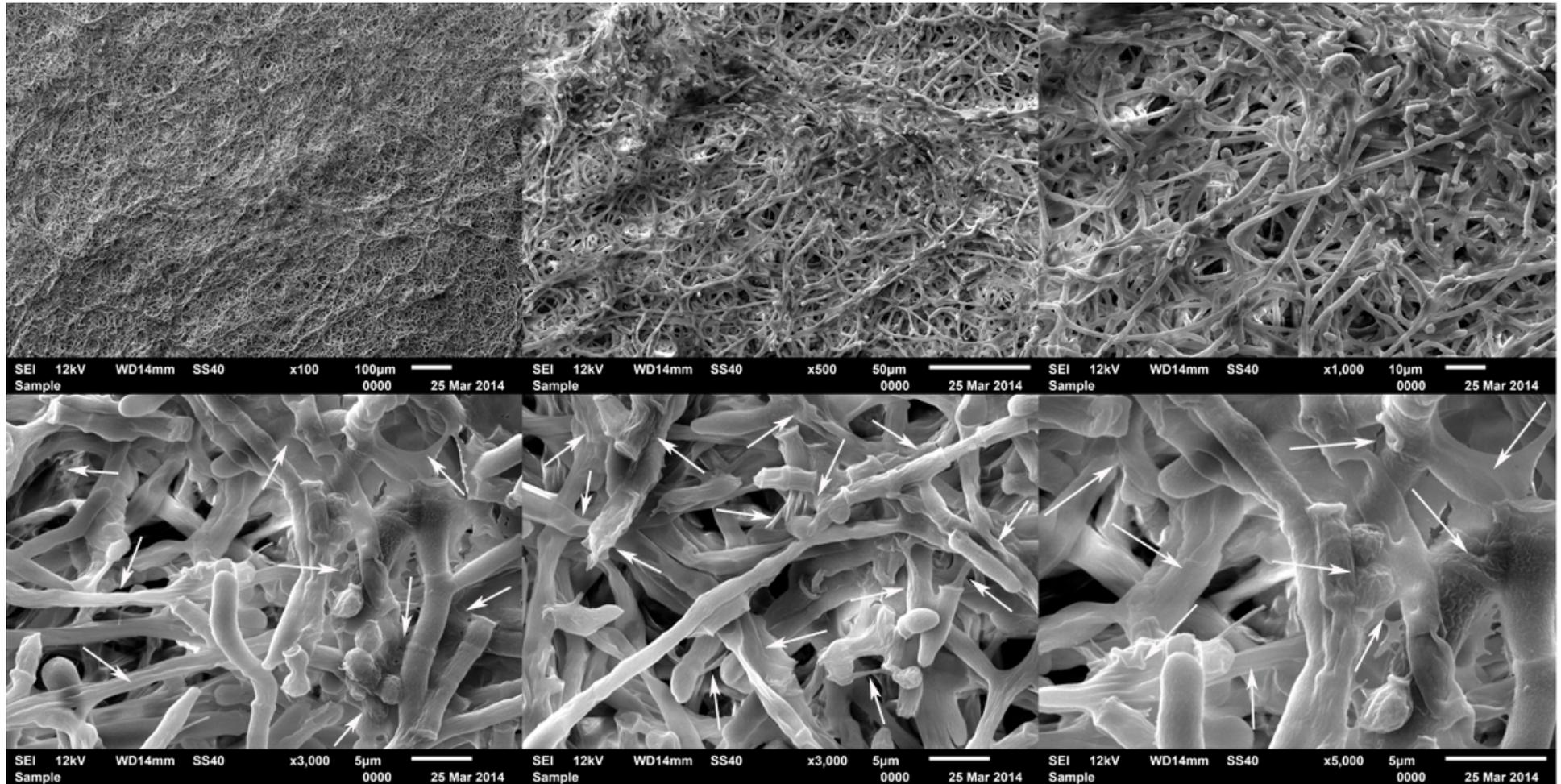


Figura 18. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro de *T. rubrum* ATCC 28189 formado em DMEM com soro fetal bovino. As setas apontam a matriz extracelular. Nota-se a presença de artroconídios e microconídios presos ao material polissacarídico.



As figuras 19, 20 e 21 representam os biofilmes maduros de *T. rubrum* 143 formados nos meios RPMI, BHI e DMEM com soro fetal bovino, respectivamente. Nota-se também, nos três meios, a formação de uma biomassa compacta e a presença de material polissacarídico cobrindo e conectando as hifas.

Figura 19. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro de *T. rubrum* 143 formado em meio RPMI. As setas apontam a matriz extracelular.

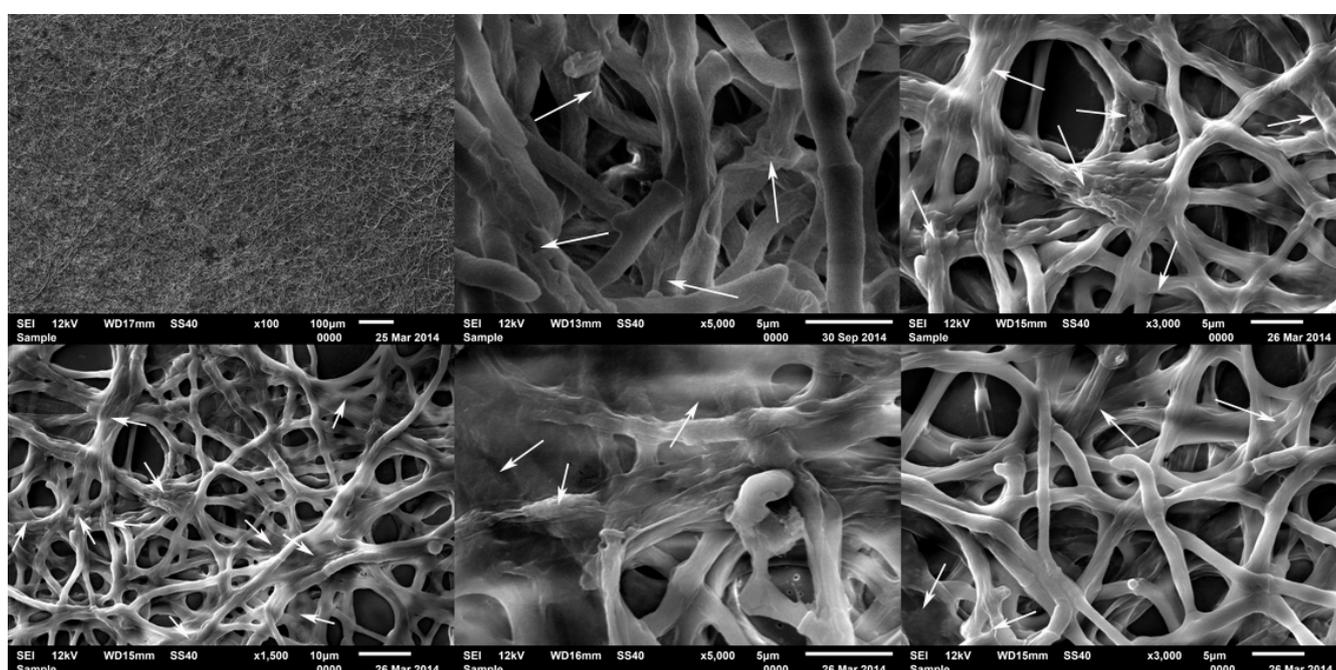


Figura 20. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro de *T. rubrum* 143 formado em meio BHI. As setas apontam a matriz extracelular.

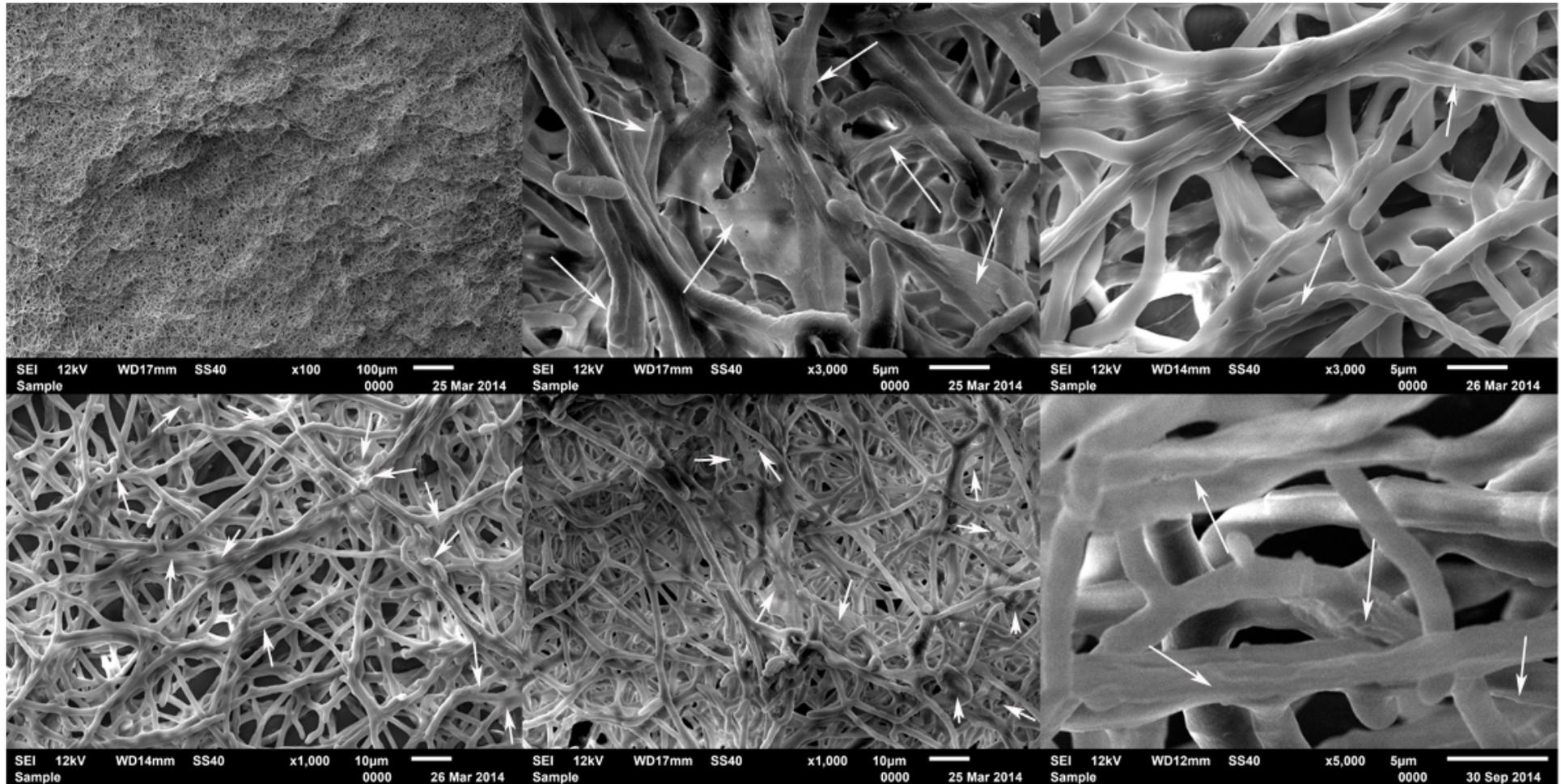
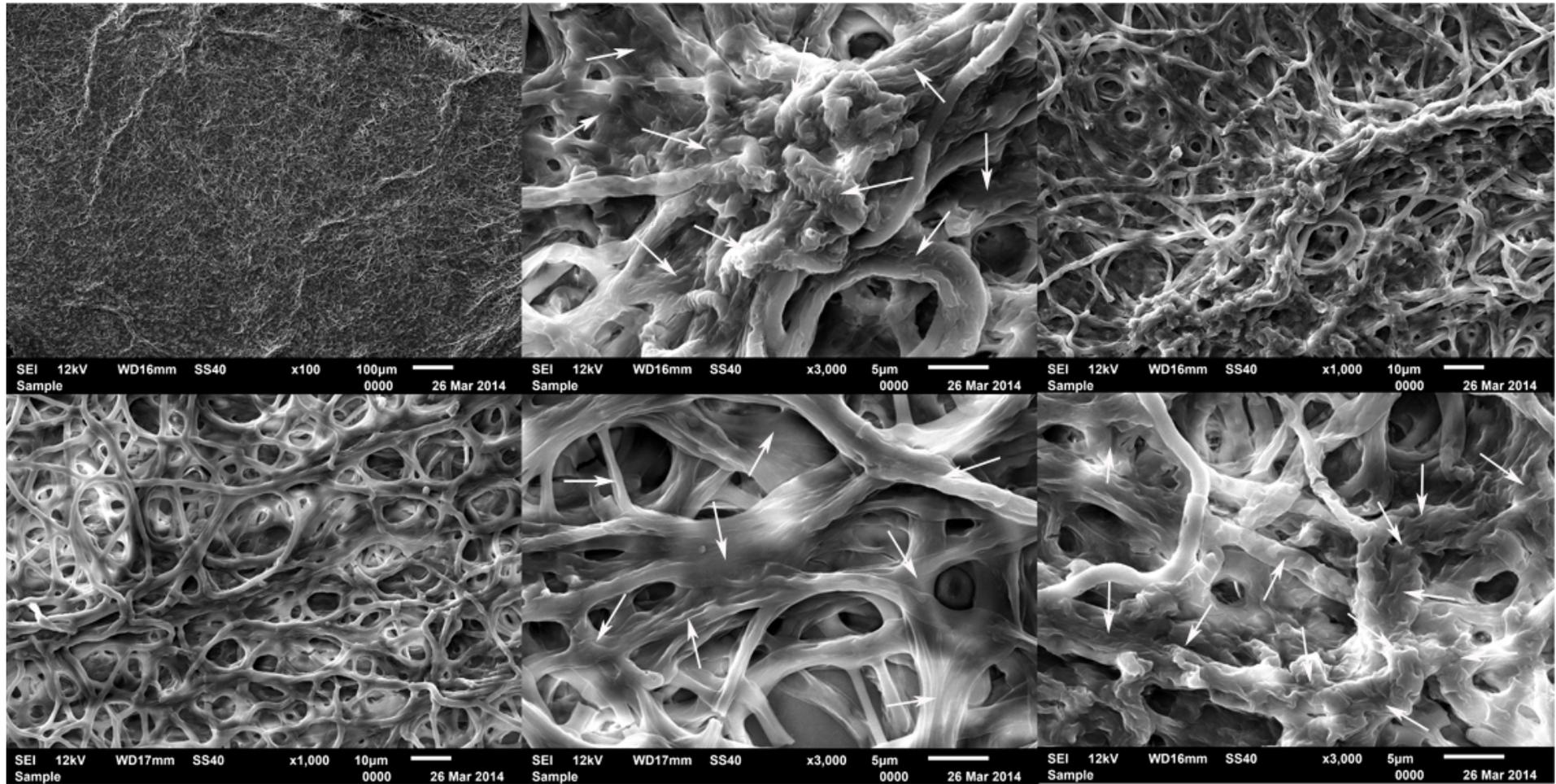


Figura 21. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro de *T. rubrum* 143 formado em meio DMEM com soro fetal bovino. As setas apontam a matriz extracelular.



As **figuras 22, 23 e 24** mostram as topografias dos biofilmes maduros de *T. mentagrophytes* ATCC 11481 formados nos meios RPMI, BHI e DMEM, respectivamente. Nota-se que a biomassa é menos compacta e que a matriz é produzida em menor quantidade quando comparada aos demais biofilmes, porém são produzidas em quantidades razoáveis. As hifas aparentam estar fortemente entrelaçadas, porém são mais espaçadas. A matriz extracelular apresentou um aspecto mais fino no biofilme de *T. mentagrophytes* ATCC 11481, formado em meio DMEM (**Fig. 24**). Nesse meio o material polissacarídico teve um aspecto de teia de aranha (**Fig. 24 D, E**).

Figura 22. Microscopia eletrônica do biofilme maduro de *T. mentagrophytes* ATCC 11481 formado em meio RPMI. As setas apontam a matriz extracelular.

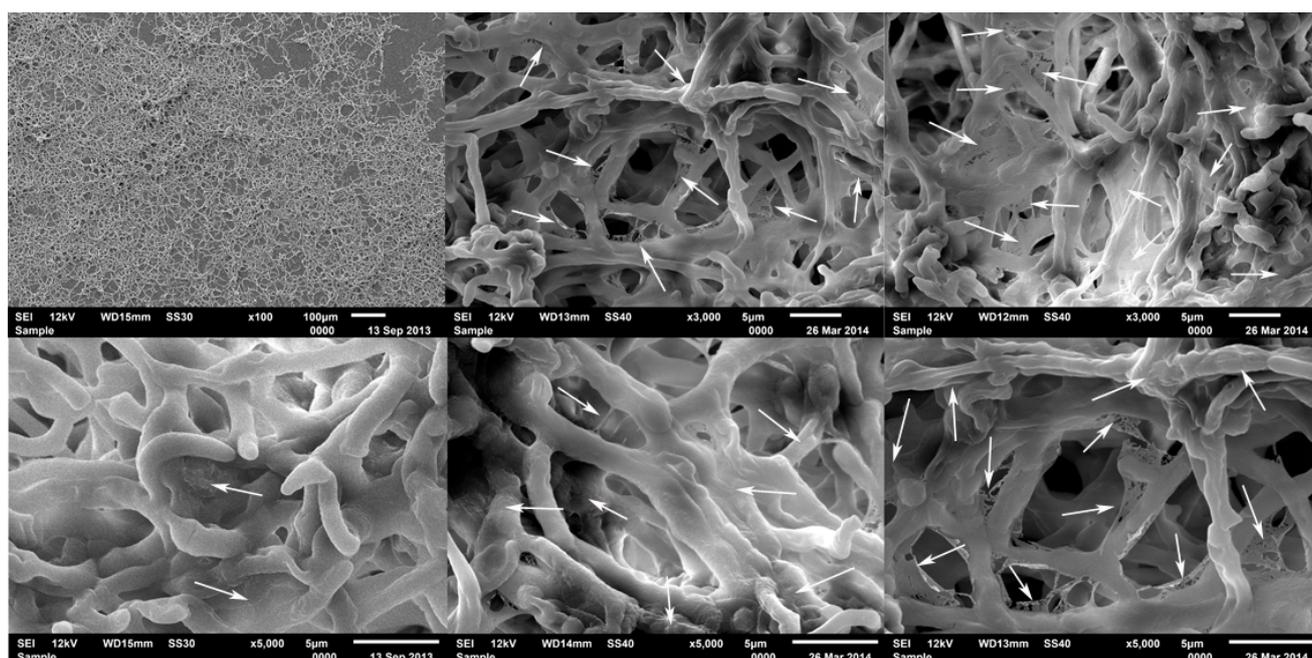


Figura 23. Microscopia eletrônica do biofilme maduro de *T. mentagrophytes* ATCC 11481 formado em meio BHI. As setas apontam a matriz extracelular.

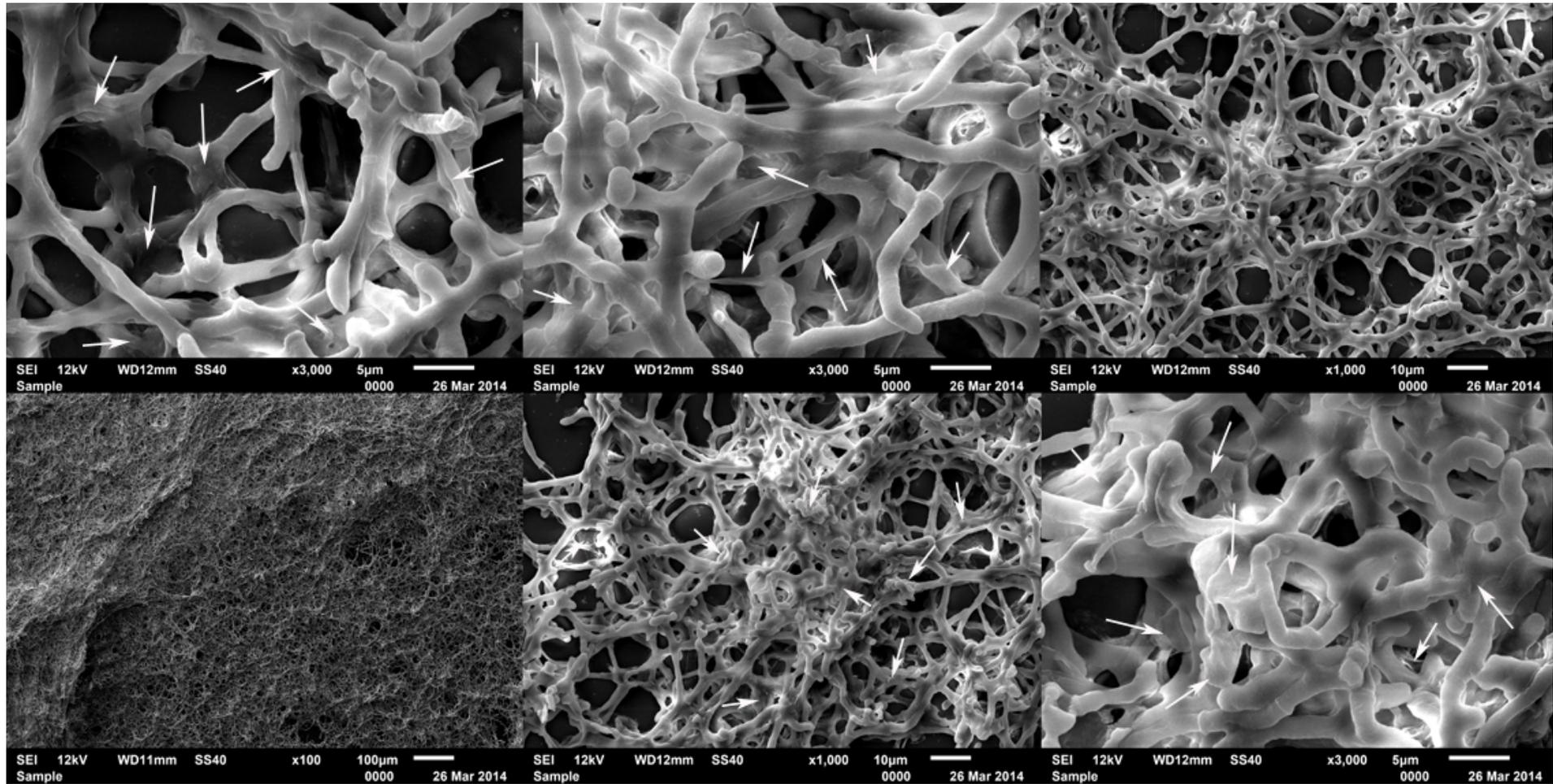
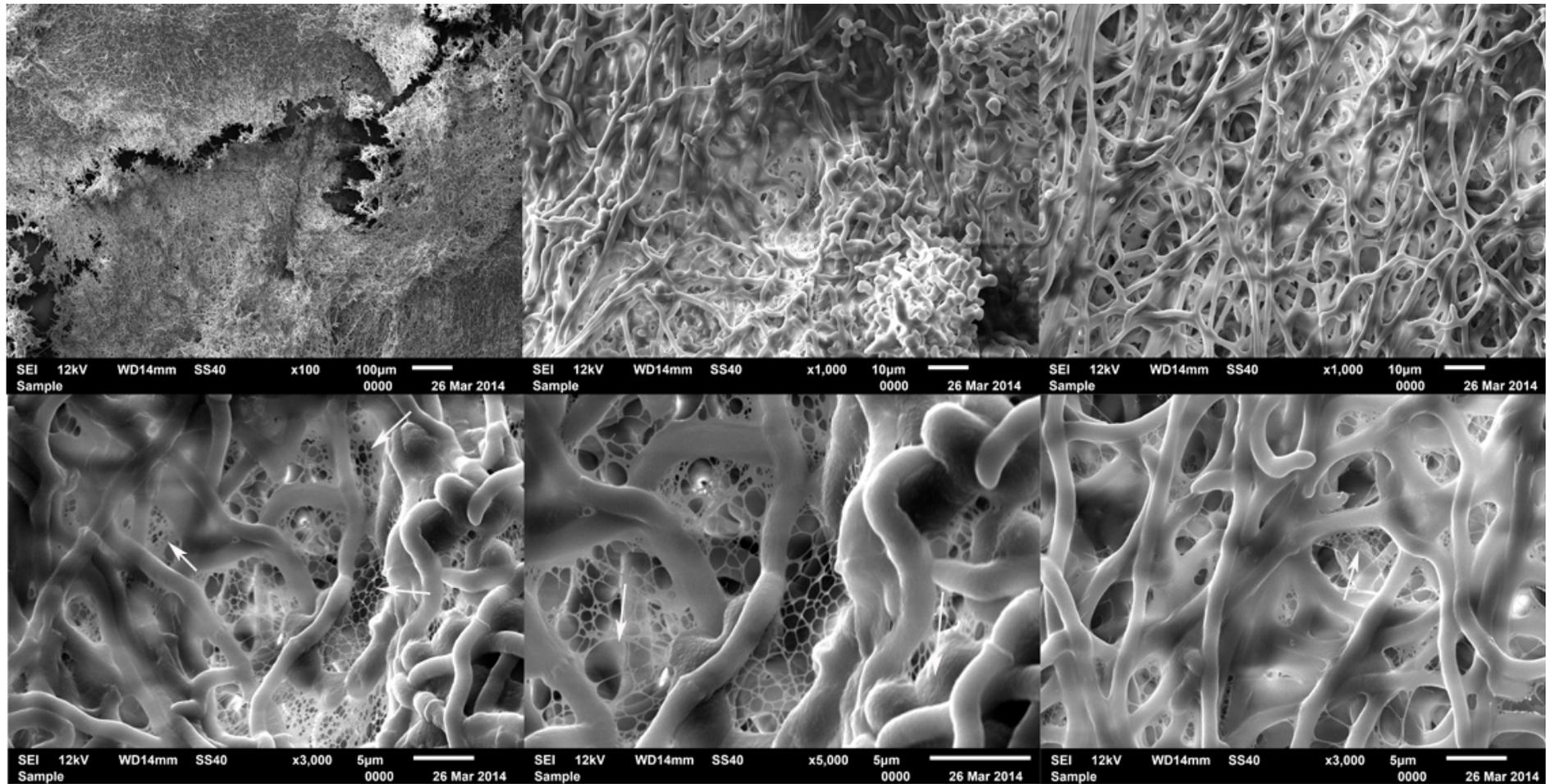


Figura 24. Microscopia eletrônica do biofilme maduro de *T. mentagrophytes* ATCC 11481 formado em meio DMEM. As setas apontam a matriz extracelular.



Por fim, as **figuras 25, 26 e 27** mostram os biofilmes de *T. mentagrophytes* 66 formados nos mesmos meios (RPMI, BHI e DMEM). A biomassa mostrou-se compacta e a matriz extracelular aparentou mais fina do que a matriz mostrada nos biofilmes de *T. rubrum* e mais grossa que a de *T. mentagrophytes* ATCC 11481. Nota-se também que há poucas regiões com acúmulo de material polissacarídico, que parece estar cobrindo as hifas como uma capa de proteção.

Figura 25. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro de *T. mentagrophytes* 66 formado em meio RPMI. As setas apontam a matriz extracelular.

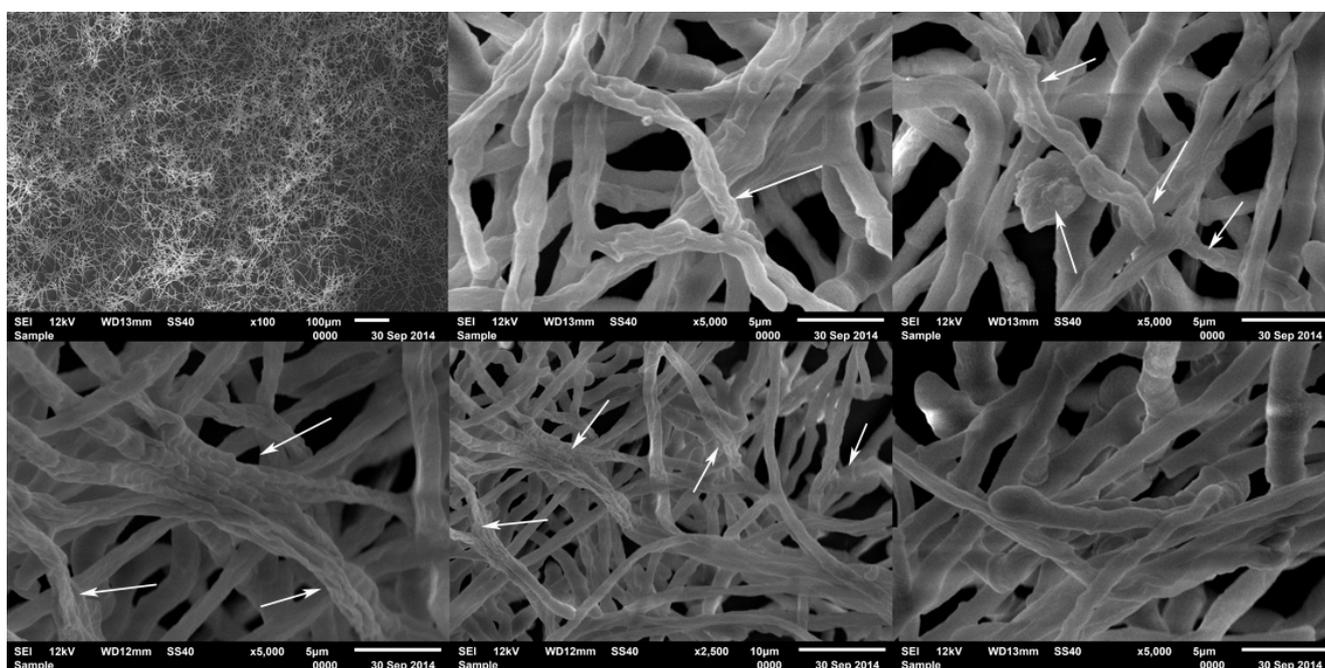


Figura 26. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro de *T. mentagrophytes* 66 formado em meio BHI. As setas apontam a matriz extracelular.

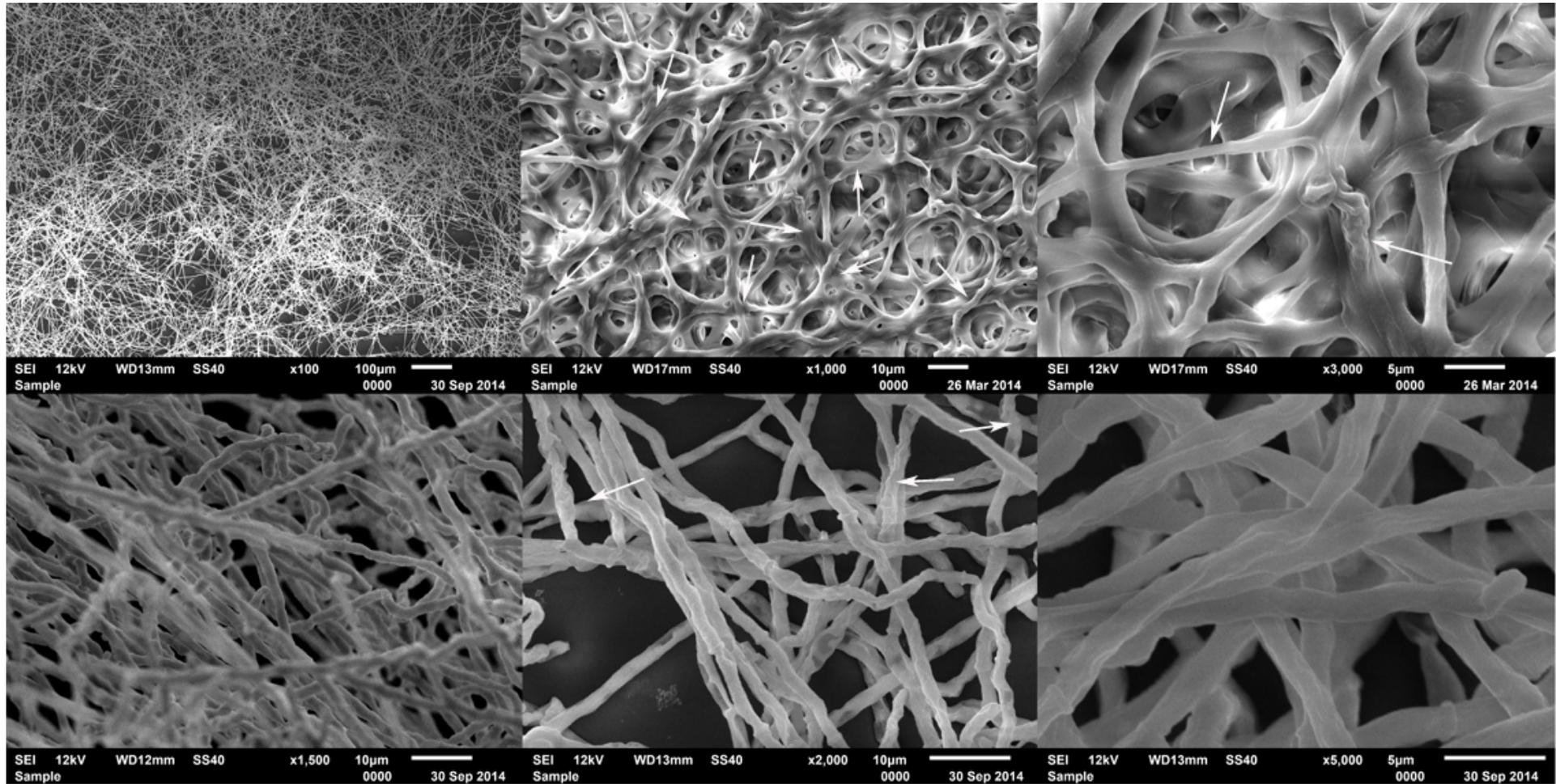
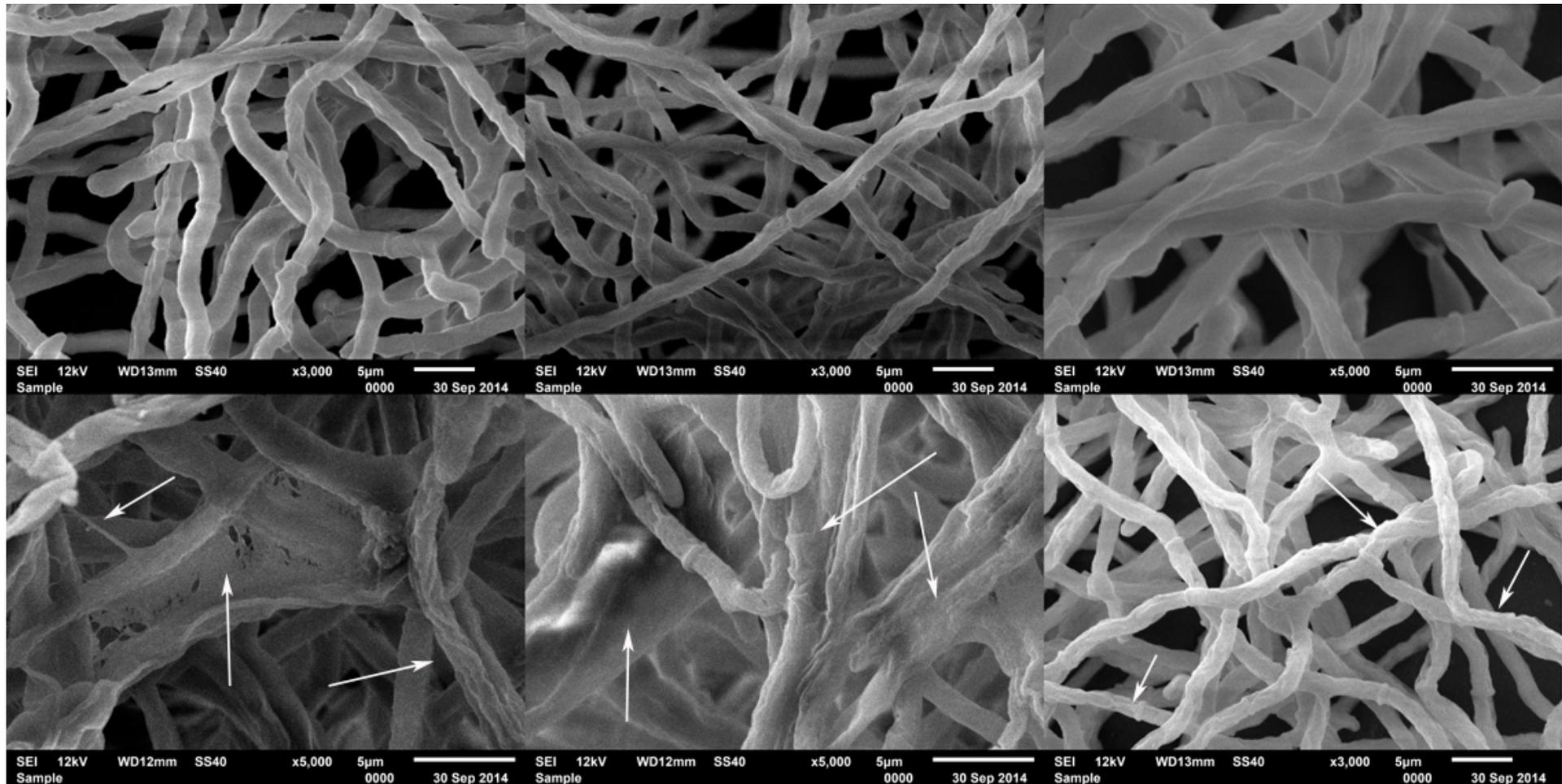


Figura 27. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme maduro de *T. mentagrophytes* 66 formado em meio DMEM. As setas apontam a matriz extracelular.



4.4.5. Microscopia confocal de varredura a laser

Inicialmente, a microscopia confocal foi feita apenas com os biofilmes formados pelas cepas ATCC de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*, em meio RPMI. A biomassa foi comparada através de seções (**Fig. 28**), e A, B e C representam a base, o meio e o topo do biofilme maduro de *T. mentagrophytes* ATCC 11481, enquanto D, E e F representam as mesmas seções do biofilme maduro de *T. rubrum* ATCC 28189.

A Concanavalina A (ConA) cora a parede celular fúngica e a matriz extracelular de verde fluorescente intenso, enquanto FUN 1 cora as células ativas em vermelho (**Fig. 29**). As espessuras dos biofilmes também foram medidas por microscópio confocal. *T. rubrum* ATCC teve espessura máxima de 249,67 μm ; mínima de 120 μm e uma espessura média de 172,27 μm . Os biofilmes de *T. mentagrophytes* ATCC tiveram espessura máxima de 134,82 μm , mínima de 34,24 μm e uma espessura média de 65,51 μm . A letra A representa uma seção do biofilme maduro de *T. mentagrophytes* ATCC 11481 com as hifas e o material polissacarídeo corado de verde, as células ativas de vermelho e uma imagem tridimensional, mostrando a sobreposição dos dois corantes e a espessura do biofilme. Já a letra B representa uma seção do biofilme maduro de *T. rubrum* ATCC com as mesmas características. Nota-se que o biofilme de *T. rubrum* ATCC produziu mais biomassa e é mais espesso que o biofilme de *T. mentagrophytes* ATCC.

Posteriormente, a microscopia confocal foi feita com os biofilmes das quatro cepas formados nos três meios diferentes (RPMI, BHI e DMEM). As imagens capturadas pelo software LAS AF 1.8.2 build 1465 da *Leica Microsystems* (**Fig. 30**), mostram a parede celular fúngica e a matriz extracelular coradas em verde; as células ativas coradas em vermelho; a sobreposição dos dois corantes (co-localização) e os cortes ortogonais, mostrando a espessura dos biofilmes em 3D nos três meios diferentes. As letras **A**, **B** e **C** representam os biofilmes de *T. rubrum* ATCC 28189 formados em RPMI, BHI e DMEM, com espessuras de **94,67**; **60,42** e **33,23 μm** , respectivamente. As letras **D**, **E** e

F representam os biofilmes de *T. rubrum* 143, formados nos mesmos meios, com espessuras de **40,28; 34,24 e 41,31 μm** . **G, H e I** representam o biofilme maduro de *T. mentagrophytes* ATCC 11481 formado em RPMI, BHI e DMEM, com espessuras de **60,42; 42,3 e 39,28 μm** . Por último, **J, K e L** representam o biofilme de *T. mentagrophytes* 66, formado nos mesmos meios anteriores e com espessuras de **60,55; 46,33 e 62,77 μm** . Os meios RPMI e DMEM, aparentemente, produziram biofilmes mais espessos, enquanto o meio BHI visivelmente produziu biofilmes mais densos e compactos.

Algumas características como pH, níveis de nutrientes, força iônica e temperatura têm um papel fundamental na adesão de um microrganismo a um substrato (Donlan, 2002). Além das características do meio de cultura, a superfície celular e o substrato também são capazes de influenciar a adesão. Cowan e colaboradores (1991) mostraram que o aumento da concentração de nutrientes é correlacionado ao aumento de adesão de bactérias na formação do biofilme. Essa teoria corrobora com os resultados obtidos no presente trabalho, que indicaram que, no geral, os biofilmes produziram mais biomassa e matriz extracelular quando formados nos meios RPMI e BHI, que são meios ricos em nutrientes. Os fatores responsáveis pela adesão dos dermatófitos às várias superfícies ainda não foram bem elucidados, porém sabe-se que a habilidade de *T. rubrum* em aderir às células epiteliais deve-se à ação de adesinas carboidrato-específicas que são expressas na superfície dos microconídios (Vermout *et al.*, 2008).

Os primeiros conceitos de biofilmes para dermatófitos foram introduzidos por Burkhart e colaboradores (2002) para explicar os dermatofitomas (massas circunscritas brancas e densas de fungos que vivem entre e sob a placa ungueal). Os dermatofitomas são mais resistentes à terapia tradicional e possuem mais de uma espécie fúngica fortemente aderida à placa ungueal e que sobrevive em achados histológicos. Nesse trabalho, foram descritas, pela primeira vez, as características dos biofilmes de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*, formados em superfícies abióticas. A habilidade de adesão e de formar biofilmes foi avaliada por meio de microscopia óptica, a fim de verificar a cinética

de crescimento dos biofilmes nas superfícies de poliestireno. O período de adesão de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* nas placas corroborou com o descrito por Zurita & Hay (1987), que descreveram um período de 3 a 4 horas para aderência máxima dos artroconídios de *Trichophyton* spp a queratinócitos (Vermout *et al.*, 2008). Os biofilmes de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* foram capazes de se desenvolver em todos os meios testados, porém, entre eles, BHI e RPMI, principalmente, mostraram-se ótimos para o desenvolvimento dos biofilmes. O meio RPMI é comumente utilizado para a formação de biofilmes *in vitro* por diversas espécies fúngicas (Seidler, Salvenmoser & Muller, 2008; Pires, Santos, *et al.*, 2011; Sengupta *et al.*, 2012; Peiqian *et al.*, 2013). Já o caldo BHI é mais utilizado para a formação de biofilmes bacterianos (Fitzpatrick *et al.*, 2002; Sandoe *et al.*, 2003; Mirani *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2015), porém há descrições do seu uso para a formação de biofilmes fúngicos (Pitangui *et al.*, 2012).

As mudanças estruturais e fenotípicas associadas ao desenvolvimento de biofilmes maduros contribuem para os microrganismos em vários aspectos no seu ciclo de vida. Entre esses benefícios estão incluídos a adesão forte a superfícies; colonização dos tecidos do hospedeiro; a expressão ou aumento dos fatores de virulência; a proteção contra o estresse; a captura eficiente de nutrientes; o aumento da comunicação célula a célula; a dispersão e a sobrevivência mediante condições adversas (Harding *et al.*, 2009).

Figura 28. Microscopia confocal dos biofilmes maduros de *T. mentagrophytes* ATCC 11481 e *T. rubrum* ATCC 28189. As imagens representam as bases (A, D); o meio (B, E) e os topos dos biofilmes (C, F).

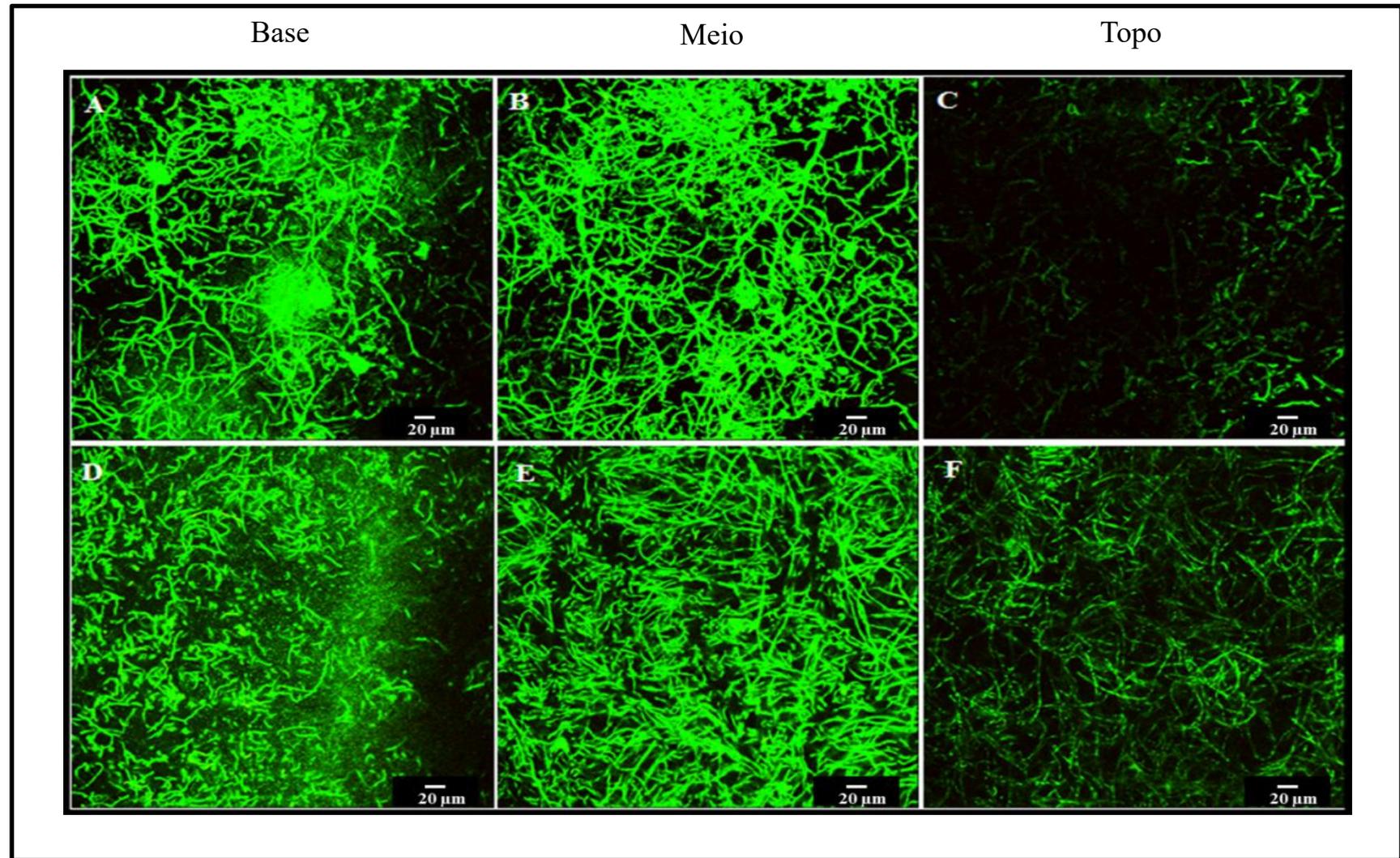


Figura 29. Microscopia Confocal de Varredura a Laser dos biofilmes maduros de *T. mentagrophytes* ATCC 11481 (A) e *T. rubrum* ATCC 28189 (B). A Concanavalina A (ConA) cora a parede celular fúngica e a matriz extracelular de verde fluorescente, enquanto FUN 1 cora a as células ativas em vermelho.

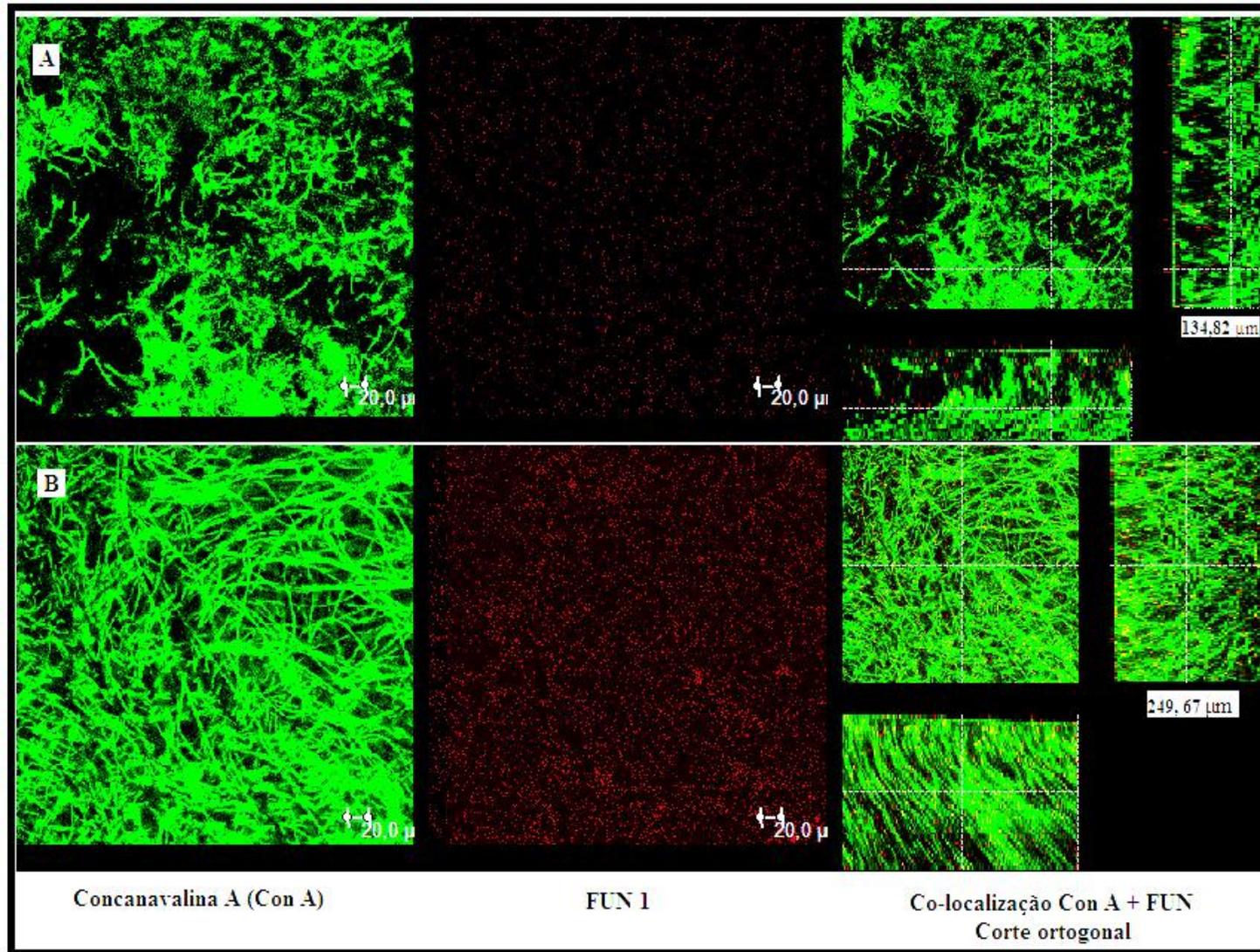
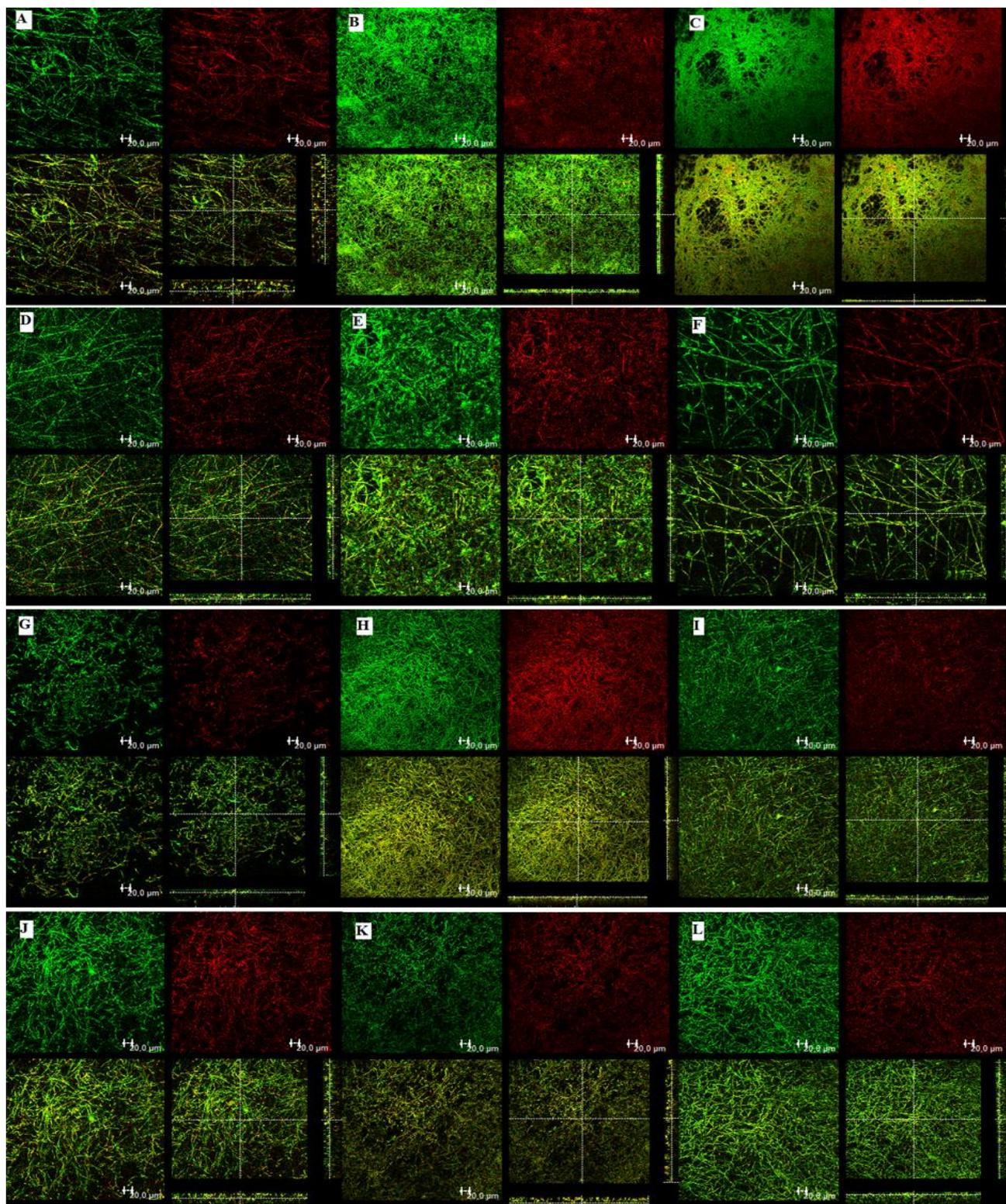


Figura 30. Microscopia confocal dos biofilmes maduros de *T. rubrum* ATCC 28189 (A, B e C), *T. rubrum* 143 (D, E e F), *T. mentagrophytes* ATCC 11481 (G, H e I) e *T. mentagrophytes* 66 (J, K e L), formados em meio RPMI, BHI e DMEM, respectivamente. Em cada figura observa-se a parede fúngica e a matriz extracelular coradas em verde, as células ativas coradas em vermelho, a sobreposição das duas cores (co-localização) e o corte ortogonal com a espessura dos biofilmes em 3D.



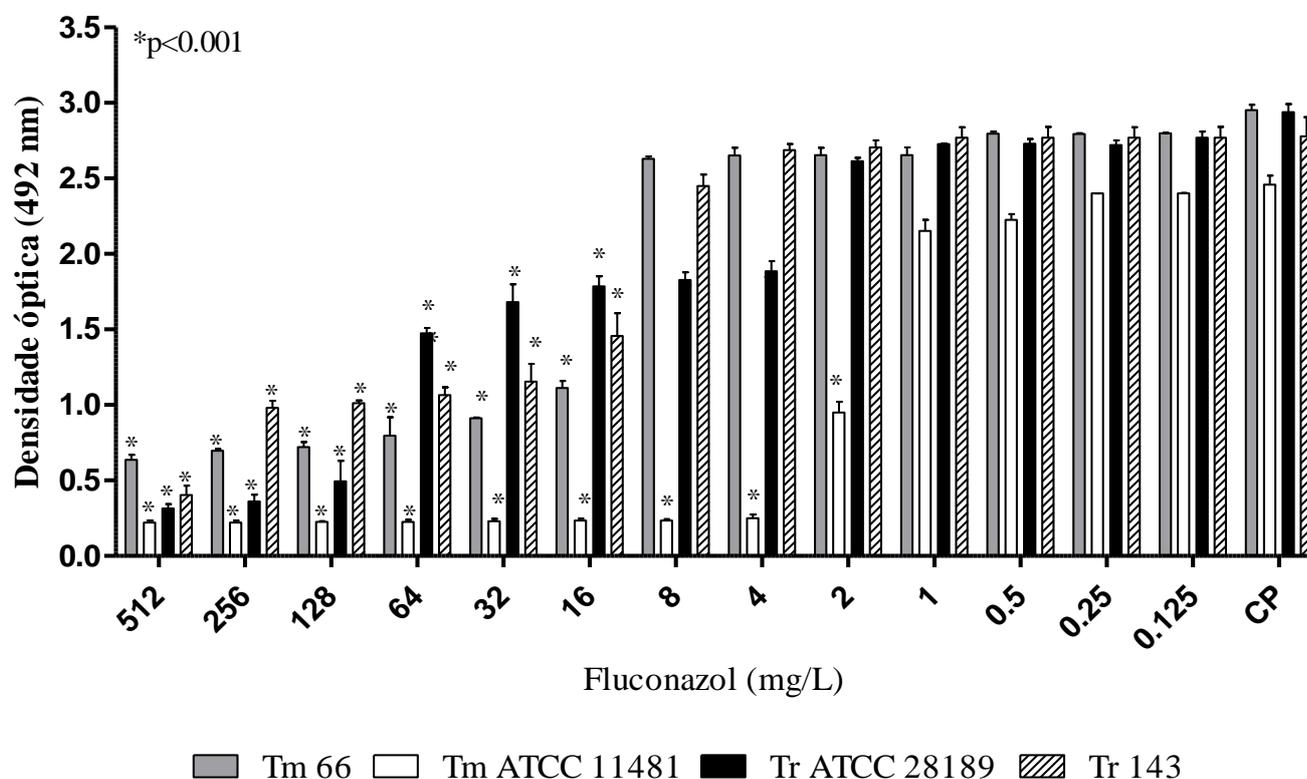
4.4.6. Efeito dos fármacos antifúngicos e dos derivados do ácido protocatecuico nas células planctônicas

Como apresentado no item 4.3 e na **Tabela 4**, o protocatecuato de nonila foi o derivado do ácido protocatecuico que apresentou o melhor índice de seletividade. Sendo assim, para a avaliação dos efeitos dos fármacos e dos compostos nas células planctônicas de duas cepas e dois isolados clínicos do gênero *Trichophyton*, os inóculos foram preparados em meio RPMI 1640 e co-incubados por 72 horas com as soluções-trabalho do protocatecuato de nonila e dos fármacos fluconazol, terbinafina e griseofulvina, nas seguintes concentrações: nonila: 500 - 0.015 mg/L; fluconazol e griseofulvina: 512-0.0625 mg/L e terbinafina: 32-0.001 mg/L. Também foram incluídos no ensaio os controles de esterilidade (controle negativo) e o controle positivo (inóculo sem tratamento). Após esse período de incubação, as atividades metabólicas das células planctônicas foram quantificadas através do ensaio de redução do XTT e as placas foram lidas em leitor de Elisa, no comprimento de onda de 492 nm. Em razão de não existir padronização descrita, este trabalho adotou os critérios de inibição para testes de microdiluição em caldo (CLSI, M38-A2, 2008).

Para o fluconazol e a griseofulvina, foi considerada inibição, a redução de 50% da atividade metabólica em comparação ao controle positivo, livre do fármaco (100% de viabilidade) e, para a terbinafina e o protocatecuato de nonila, a redução de 80% na atividade metabólica. A interpretação para o protocatecuato de nonila foi baseada nos resultados da concentração fungicida mínima, dispostos nas **Tabelas 2 e 3** que indicaram que, para todas as cepas testadas, nonila teve um comportamento fungicida. Os dados foram analisados através da medida da densidade óptica, conforme previamente descrito por Martinez & Casadevall (2006) para os biofilmes de *Cryptococcus neoformans*.

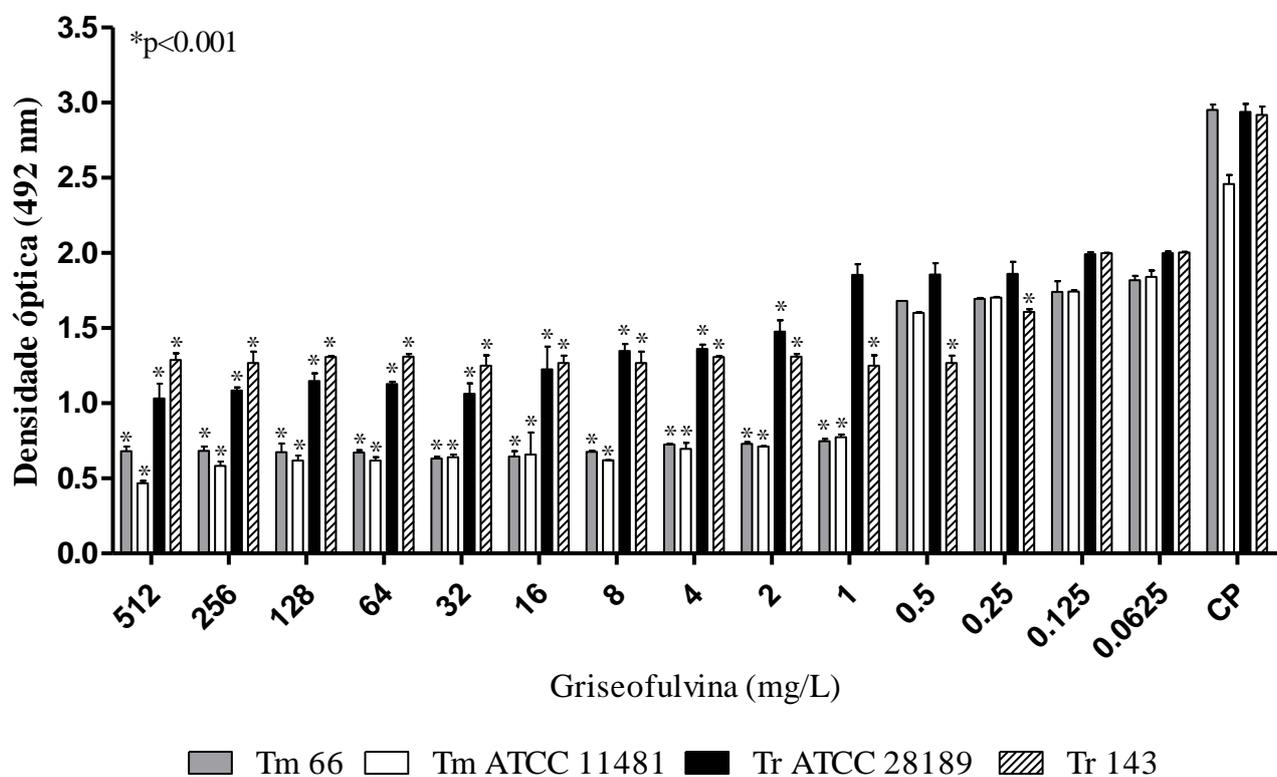
Para o fluconazol, as concentrações que inibiram o crescimento das células planctônicas nas cepas e isolados de *T. mentagrophytes* 66, *T. mentagrophytes* ATCC 11481, *T. rubrum* ATCC 28189 e *T. rubrum* 143 foram as maiores ou iguais a 16; 2; 64 e 16 mg/L, respectivamente (**Fig. 31**).

Figura 31. Efeito do fluconazol nas células planctônicas de *Trichophyton* spp. determinado pelo teste de redução da atividade metabólica (XTT). Os dados representam a média e o desvio padrão obtidos com a triplicata dos ensaios. Os asteriscos denotam redução significativa (* $p < 0.001$) da atividade metabólica em comparação ao controle livre do fármaco (CP).



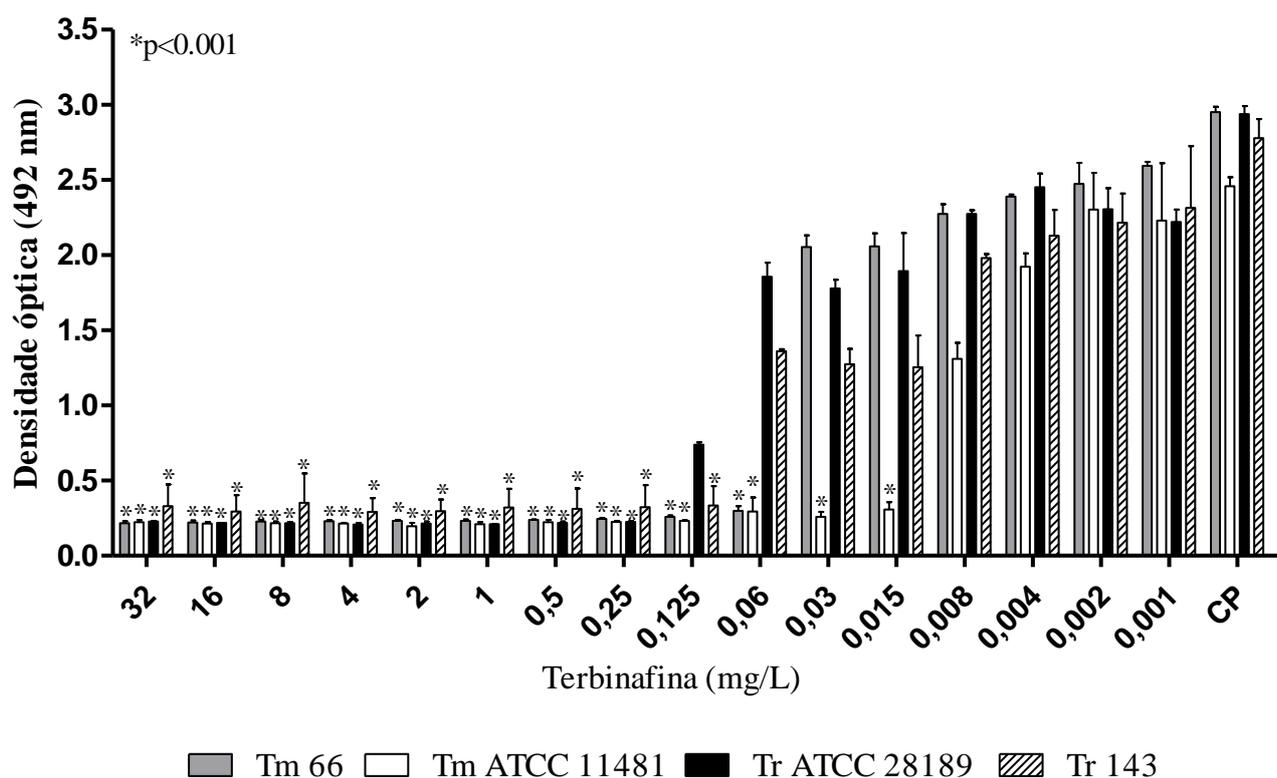
Para a griseofulvina, as concentrações do fármaco que inibiram o crescimento das células planctônicas das mesmas cepas e isolados clínicos anteriormente citadas foram as maiores ou iguais a 1; 1; 2 e 0,25 mg/L (Fig. 32).

Figura 32. Efeito da griseofulvina nas células planctônicas de *Trichophyton* spp., determinado pelo teste de redução da atividade metabólica (XTT). Os dados representam a média e o desvio padrão obtidos com a triplicata dos ensaios. Os asteriscos denotam redução significativa ($*p < 0.001$) da atividade metabólica em comparação ao controle livre do fármaco (CP).



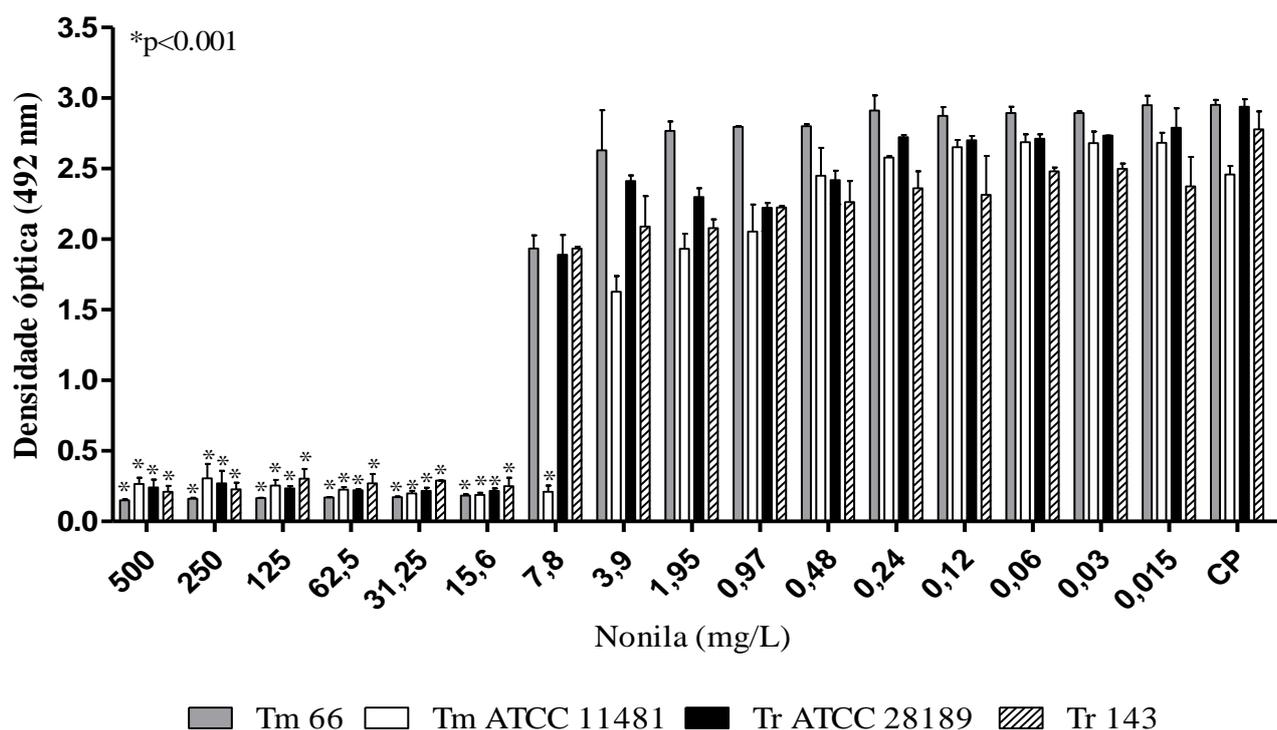
A terbinafina possui ação fungicida contra os dermatófitos (Grover e Khurana, 2012). O documento M38-A2 preconiza que a região de concentração inibitória mínima do dermatófito tratado com a terbinafina deve conter uma inibição de crescimento correspondente a 80% ou mais. Sendo assim, para esse fármaco, as concentrações que inibiram o crescimento das células planctônicas de *T. mentagrophytes* 66, de *T. mentagrophytes* ATCC 11481, *T. rubrum* ATCC 28189 e *T. rubrum* 143 foram maiores ou iguais a 0,06; 0,015; 0,25 e 0,125 mg/L (Fig. 33).

Figura 33. Efeito da terbinafina na prevenção da formação de biofilmes de *Trichophyton* spp. determinado pelo teste de redução da atividade metabólica (XTT). Os dados representam a média e o desvio padrão obtidos com a triplicata dos ensaios. Os asteriscos denotam redução significativa (* $p < 0.001$) da atividade metabólica em comparação ao controle livre do fármaco (CP).



Para o protocatecuato de nonila, as concentrações acima ou iguais a 7,8 mg/L inibiram o crescimento das células de *T. mentagrophytes* ATCC 11481. Para as demais cepas, as concentrações maiores ou iguais a 15,6 mg/L preveniram o crescimento das células planctônicas (**Fig. 34**). De acordo com o demonstrado, os três fármacos antifúngicos e o protocatecuato de nonila foram capazes de prevenir o crescimento das células de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* na mesma concentração dos biofilmes.

Figura 34. Efeito do protocatecuato de nonila nas células planctônicas de *Trichophyton* spp. determinado pelo teste de redução da atividade metabólica (XTT). Os dados representam a média e o desvio padrão obtidos com a triplicata dos ensaios. Os asteriscos denotam redução significativa (* $p < 0.001$) da atividade metabólica em comparação ao controle livre do fármaco (CP).



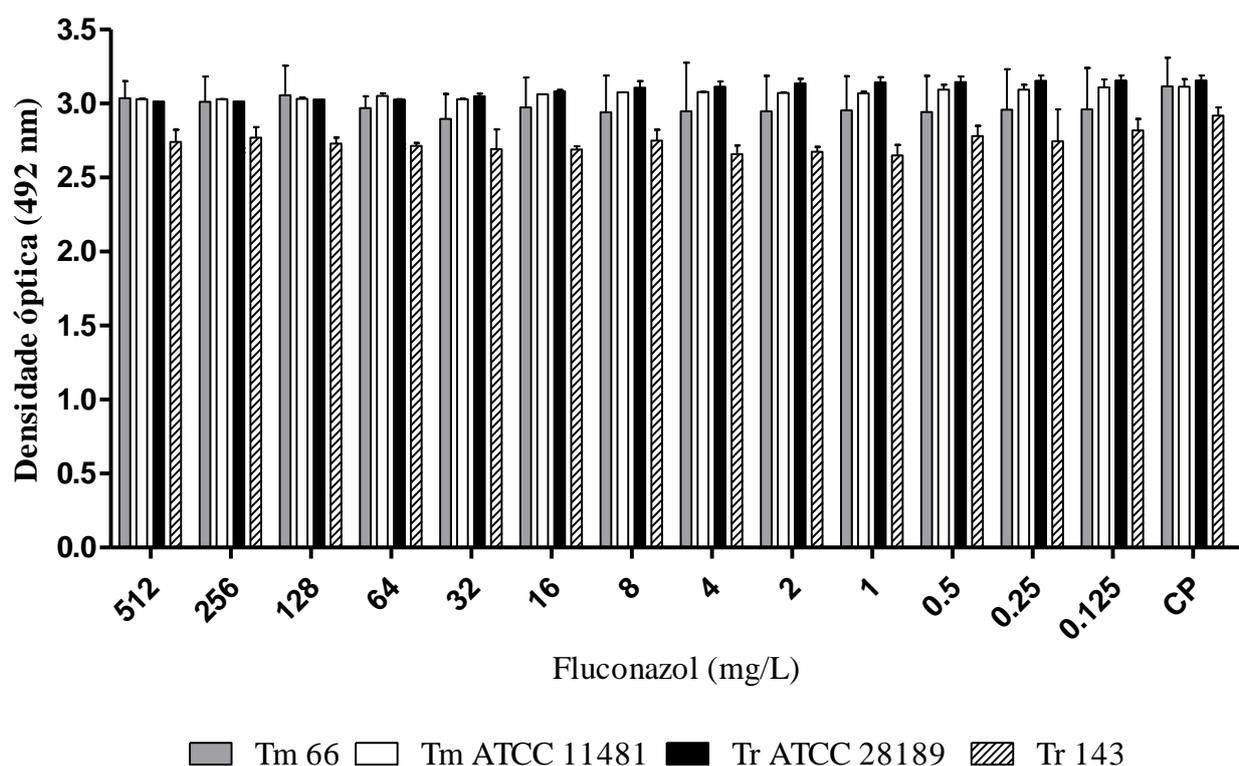
4.4.7. Efeito dos fármacos antifúngicos e do derivado do ácido protocatecuico frente aos biofilmes pré-formados de dermatófitos

Na ausência de metodologia padronizada para os testes de sensibilidade dos biofilmes formados por fungos dermatófitos, foi adotado o protocolo previamente descrito por Pierce e colaboradores (2008) para biofilmes fúngicos. Resumidamente, os biofilmes foram formados em meio RPMI e, após 72 h de crescimento, o líquido sobrenadante foi aspirado e o fluconazol, griseofulvina, terbinafina e o protocatecuato de nonila, nas mesmas concentrações descritas no item 4.4.6, foram adicionados. Após incubação por mais 72 horas, a atividade metabólica foi medida através do ensaio de redução do XTT.

Os critérios de interpretação adotados foram os seguidos para os testes de microdiluição em caldo e os mesmos do item 4.4.6: 50% de redução da atividade metabólica para fluconazol e griseofulvina e 80% de redução para terbinafina e protocatecuato de nonila, comparativamente ao controle positivo (livre de fármaco ou composto).

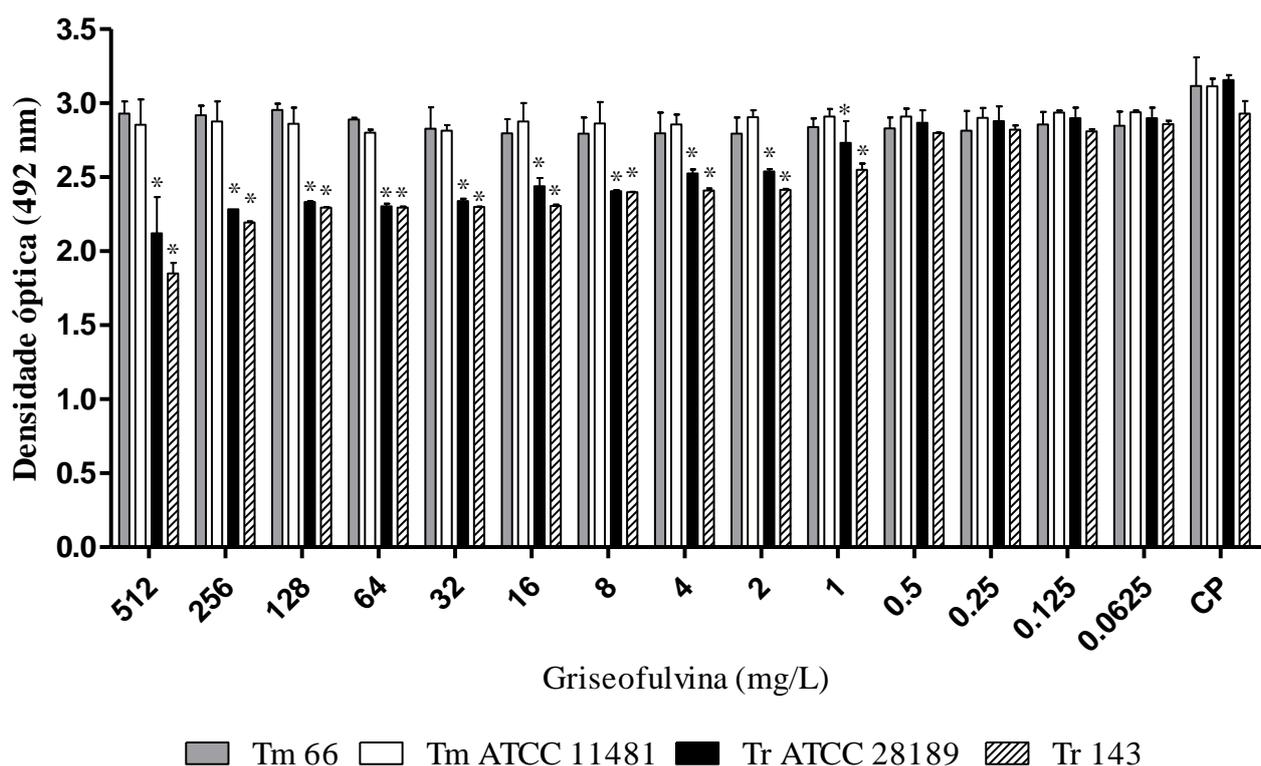
Os biofilmes de todas as cepas e isolados clínicos que foram incubados com o fluconazol nas diferentes concentrações exibiram atividades metabólicas similares às aquelas observadas nos controles positivos ($p>0.05$). Sendo assim, os biofilmes de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* exibiram resistência ao fluconazol segundo os critérios adotados (redução de 50% da atividade metabólica). (Fig.35).

Figura 35. Sensibilidade dos biofilmes maduros de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* expostos ao fluconazol. Todos os biofilmes maduros mostraram-se resistentes a esse fármaco. Os dados representam a média e o desvio padrão obtidos com a triplicata dos ensaios ($p>0.05$).



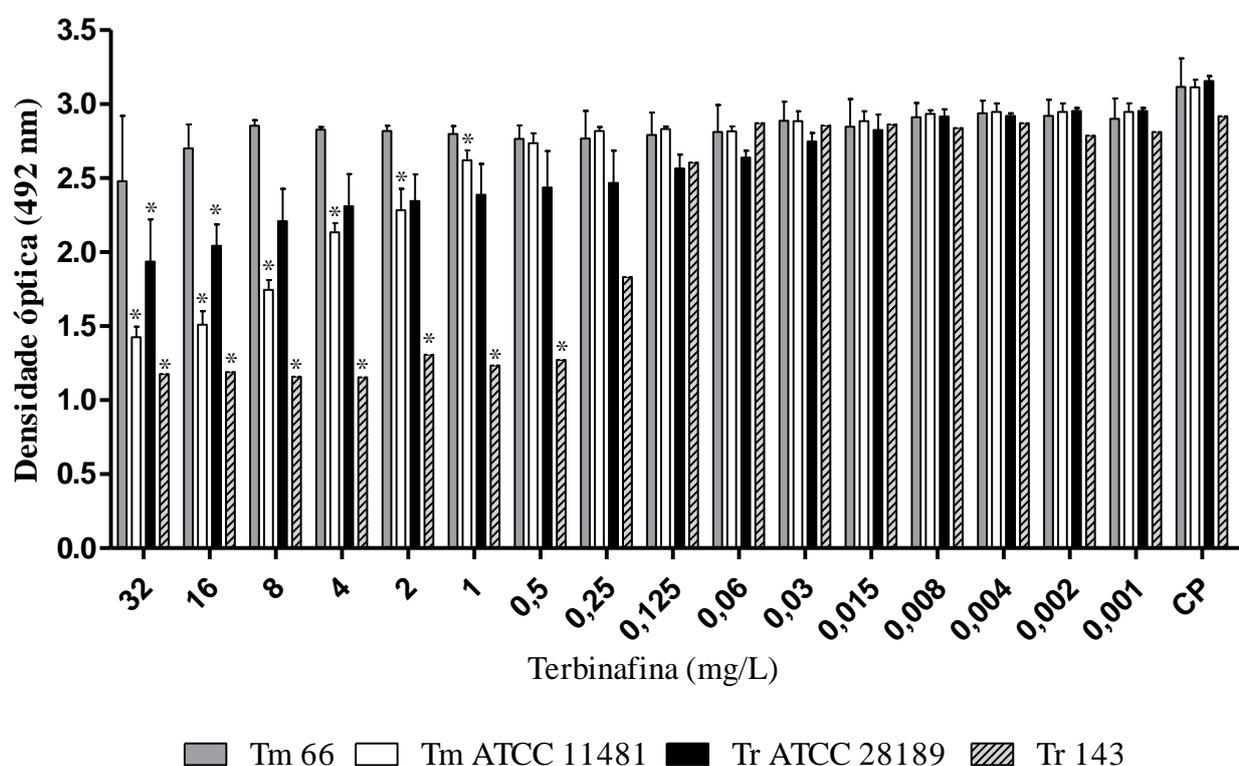
O mesmo aconteceu quando os biofilmes formados pelas quatro cepas foram incubados com a griseofulvina, nas suas várias concentrações (**Fig.36**). Para as duas cepas de *T. mentagrophytes* não houve redução nas atividades metabólicas nas diversas concentrações de griseofulvina. Para as duas cepas de *T. rubrum*, houve redução significativa ($p < 0.001$) da atividade metabólica a partir da concentração de 1 mg/L, porém não foi maior ou igual a 50%. Sendo assim, os biofilmes maduros das quatro cepas foram resistentes à griseofulvina nas diversas concentrações.

Figura 36. Sensibilidade dos biofilmes maduros de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* frente à griseofulvina. Todos os biofilmes maduros mostraram-se resistentes a esse fármaco. * $p < 0.001$ (redução significativa quando comparada ao controle positivo do teste sem fármaco – CP).



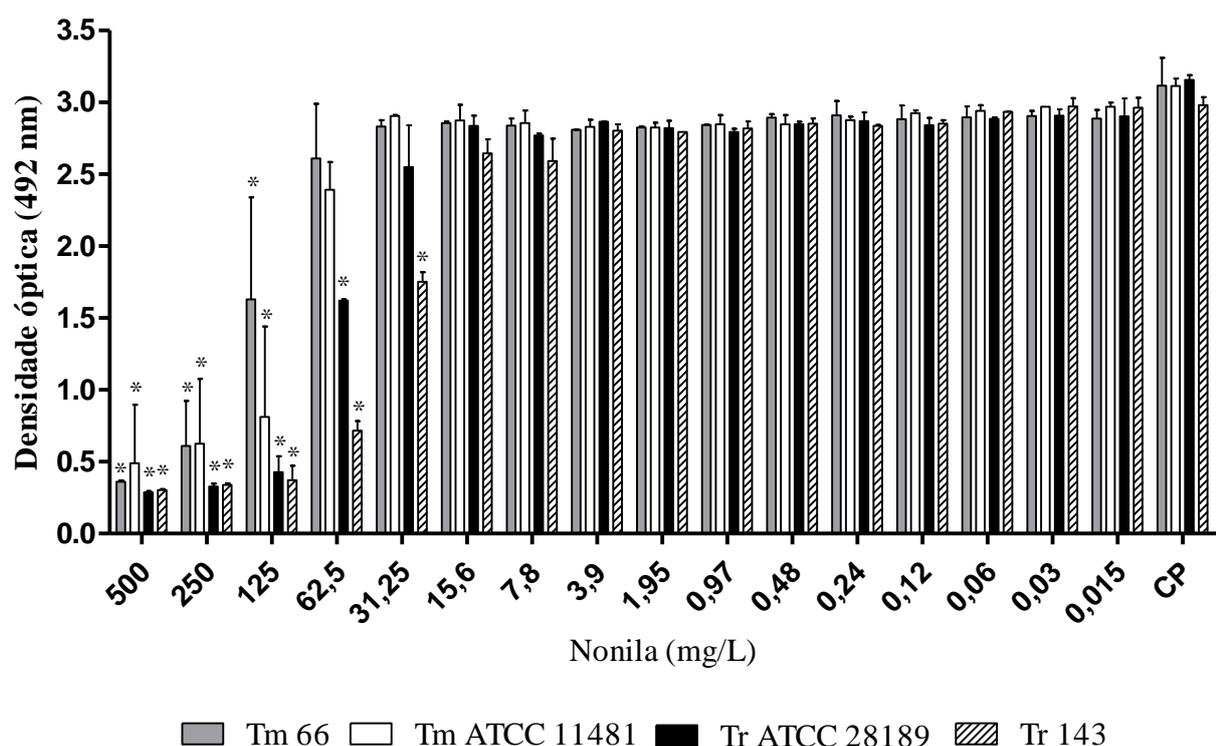
As atividades metabólicas dos biofilmes maduros tratados com a terbinafina foram representadas na **Fig. 37**. Houve redução significativa em diversas concentrações quando comparadas ao controle ($p < 0.001$), porém, para todas as cepas e em todas as concentrações testadas, a redução máxima da atividade metabólica foi de 61%. Para *T. mentagrophytes* 66 e *T. rubrum* ATCC, a redução da atividade metabólica foi menor que 50%. Para *T. mentagrophytes* ATCC, houve redução de 50% na atividade metabólica a partir da concentração de 16 mg/L. Já para a cepa clínica de *T. rubrum*, a atividade foi reduzida a 50% a partir da concentração de 0,5 mg/L. Porém, para que esse fármaco seja considerado potente contra o biofilme maduro desses fungos, a redução do metabolismo das células deveria ser maior que 80%. Sendo assim, os biofilmes maduros de *T. rubrum* 143, de *T. rubrum* ATCC, *T. mentagrophytes* ATCC e *T. mentagrophytes* 66 também se mostraram resistentes à terbinafina.

Figura 37. Sensibilidade dos biofilmes maduros de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* frente à terbinafina. Todos os biofilmes maduros mostraram-se resistentes a esse fármaco. * $p < 0.001$ (redução significativa quando comparada ao controle positivo do teste sem fármaco – CP).



O protocatecuato de nonila causou a maior diminuição das atividades metabólicas dos biofilmes maduros de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*. Para os biofilmes maduros de *T. rubrum* ATCC 28189, *T. rubrum* 143, *T. mentagrophytes* ATCC 11481 houve redução da atividade metabólica maior que 80% nas concentrações do composto maiores ou iguais a 125 mg/L. Para o biofilme de *T. mentagrophytes* 66, houve redução de 80% da atividade metabólica na concentração correspondente a 500 mg/L (**Fig.38**). Os resultados mostraram que o protocatecuato de nonila apresentou melhor atividade anti-biofilme que todos os fármacos antifúngicos testados. Contudo, nas concentrações onde ocorre a morte de mais de 80% das células ou a diminuição de 80% da atividade metabólica celular, esse composto apresentou-se tóxico para as linhagens de queratinócitos (HaCat e NHOK) e de hepatomas humanos (HepG2).

Figura 38. Sensibilidade dos biofilmes maduros de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* frente ao protocatecuato nonila, que reduziu significativamente a atividade metabólica dos biofilmes maduros de *T. rubrum* ATCC 28189, *T. rubrum* 143 e *T. mentagrophytes* ATCC 11481 nas concentrações maiores ou iguais a 125 mg/L. A atividade metabólica do biofilme de *T. mentagrophytes* 66 foi reduzida em 80% na concentração de 500 mg/L. * $p < 0.001$



4.4.8. Comparação entre as células planctônicas e em formato biofilme quanto à sensibilidade aos fármacos antifúngicos e ao derivado do ácido protocatecuico

As sensibilidades das células planctônicas aos fármacos antifúngicos e ao derivado do ácido protocatecuico foram comparadas às células em formato biofilme. Para isso, as porcentagens das atividades metabólicas foram calculadas de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ de atividade metabólica} = (\text{média da absorbância} \times 100) / \text{média do controle positivo (sem tratamento)}$$

A **Figura 39** mostra os resultados da comparação entre células planctônicas e em formato biofilme das cepas de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* após o tratamento com fluconazol. Para todas as cepas, as células planctônicas mostraram-se mais sensíveis ao tratamento com esse fármaco do que as células em formato biofilme. Para a griseofulvina, enquanto os biofilmes mostraram-se resistentes a todas as concentrações testadas (viabilidade maior que 50%), as células planctônicas tiveram a porcentagem de atividade metabólica reduzida em 50% ou mais nas concentrações iguais ou maiores que 1 mg/L para *T. mentagrophytes* 66 (**Fig. 40A**); 0,125 mg/L para *T. mentagrophytes* ATCC 11481 (**Fig. 40B**); 256 mg/L para *T. rubrum* 143 (**Fig. 40C**) e 2 mg/L para *T. rubrum* ATCC 28189 (**Fig. 40D**).

O tratamento dos biofilmes e das células planctônicas com a terbinafina mostrou um perfil semelhante ao do tratamento com os demais fármacos (**Fig.41**). Já o tratamento com o protocatecuato de nonila mostrou excelente atividade tanto para as células planctônicas, quanto para os biofilmes (**Fig. 42**). Para as duas cepas e os dois isolados clínicos testados, nas concentrações iguais ou maiores que 125 mg/L, nonila reduziu em 80% ou mais a viabilidade tanto das células planctônicas, quanto dos biofilmes ($p > 0.05$), mostrando que, nessas concentrações pode ser considerado um protótipo anti-

dermatófito potente, inibindo o crescimento das células planctônicas testadas na mesma concentração dos biofilmes e matando os biofilmes maduros. O ponto negativo é que, nessas concentrações, a nonila apresentou toxicidade contra as células testadas, sendo assim, é preciso descobrir maneiras de tornar esse composto menos tóxico, seja por modificação em sua estrutura, ou por incorporação da molécula a sistemas nanoestruturados. Com relação a esses sistemas nanoestruturados, sabe-se que antimicrobianos em nano escala podem ser designados a ter uma alta afinidade para bactérias ou fungos, atravessar barreiras ou mecanismos de resistência e, além disso, aumentar a atividade antimicrobiana. Por outro lado, os nanomateriais podem ser projetados para oferecer o desenvolvimento de fármacos de forma sustentada, controlada e orientada para evitar efeitos colaterais sistêmicos adversos associados (Landriscina, Rosen & Friedman, 2015). Dentro desse contexto, diversos autores vêm demonstrando que a encapsulação de fármacos e compostos aumenta suas atividades antimicrobianas (Choudhary & Kusum Devi, 2015; Halevas *et al.*, 2015; Parmar, Misra & Mohanty, 2015; Svetlichny *et al.*, 2015).

Figura 39. Comparação entre as células planctônicas e em formato biofilme de *Trichophyton* sp., tratados com fluconazol. A porcentagem de atividade metabólica foi determinada através do ensaio de redução do XTT. Para todas as cepas, as células planctônicas mostraram-se mais sensíveis que as células em formato biofilme, em diferentes concentrações do fármaco. Os asteriscos denotam redução significativa (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) da porcentagem de atividade metabólica das células planctônicas em comparação à porcentagem de atividade metabólica dos biofilmes tratados com a mesma concentração do fármaco.

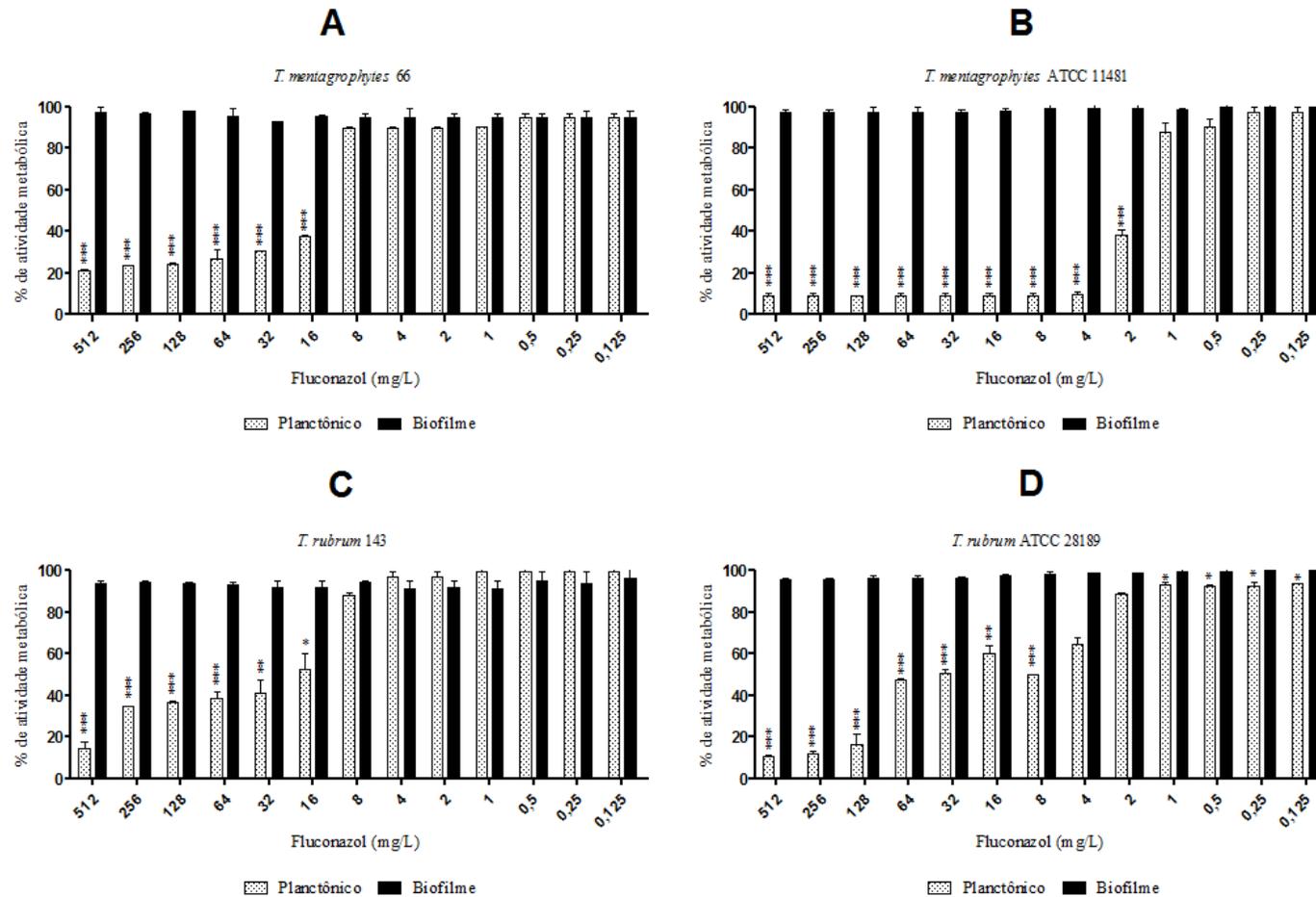


Figura 40. Comparação entre as células planctônicas e em formato biofilme de *Trichophyton* sp., tratados com griseofulvina. A porcentagem de atividade metabólica foi determinada através do ensaio de redução do XTT. Para todas as cepas, as células planctônicas mostraram-se mais sensíveis que as células em formato biofilme, em diferentes concentrações do fármaco. Os asteriscos denotam redução significativa (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) da porcentagem de atividade metabólica em comparação à porcentagem de atividade metabólica dos biofilmes tratados com a mesma concentração do fármaco.

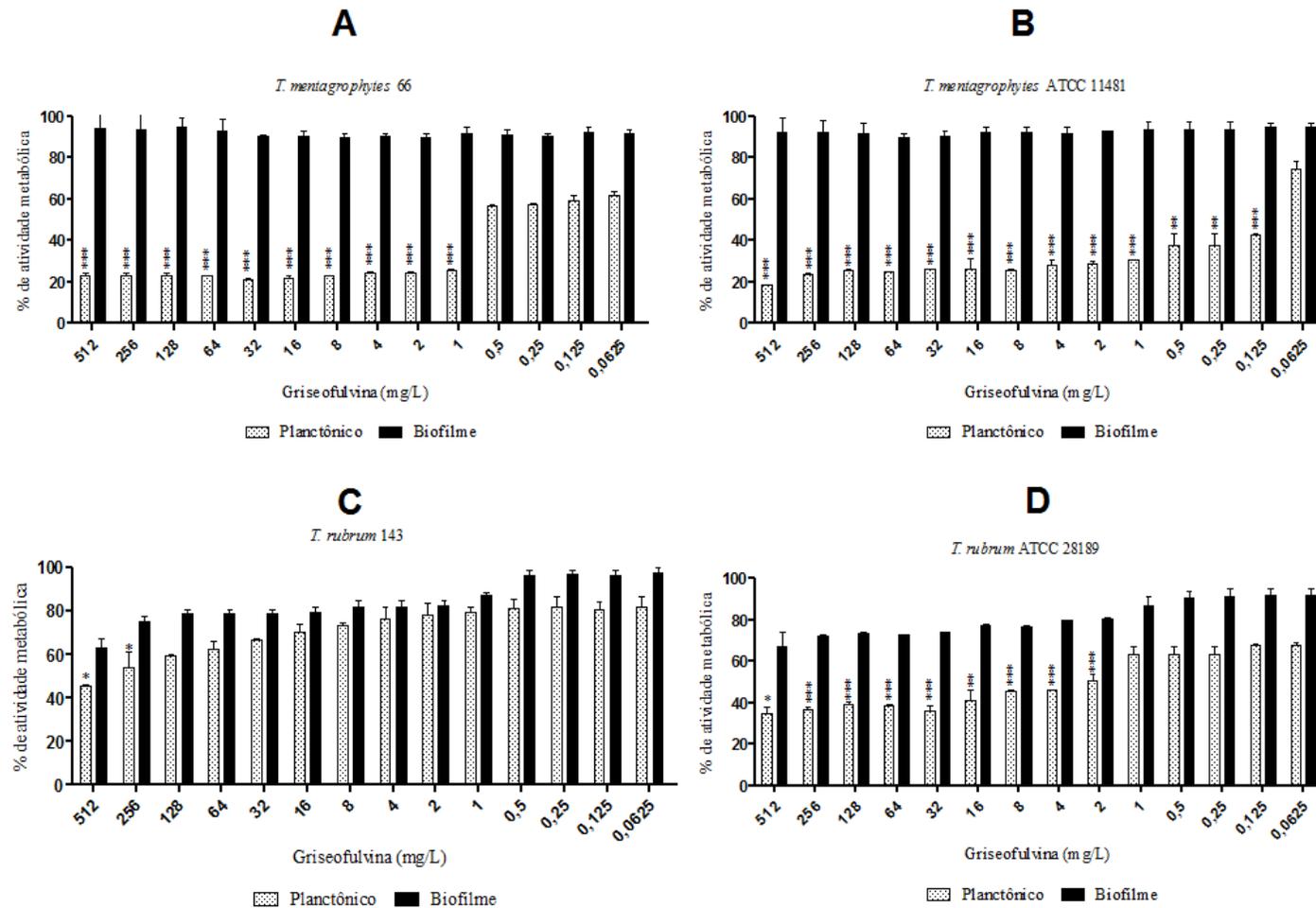


Figura 41. Comparação entre as células planctônicas e em formato biofilme de *Trichophyton* sp., tratados com terbinafina. A porcentagem de atividade metabólica foi determinada através do ensaio de redução do XTT. Para todas as cepas, as células planctônicas mostraram-se mais sensíveis que as células em formato biofilme, em diferentes concentrações do fármaco. Os asteriscos denotam redução significativa (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) da porcentagem de atividade metabólica em comparação à porcentagem de atividade metabólica dos biofilmes tratados com a mesma concentração do fármaco.

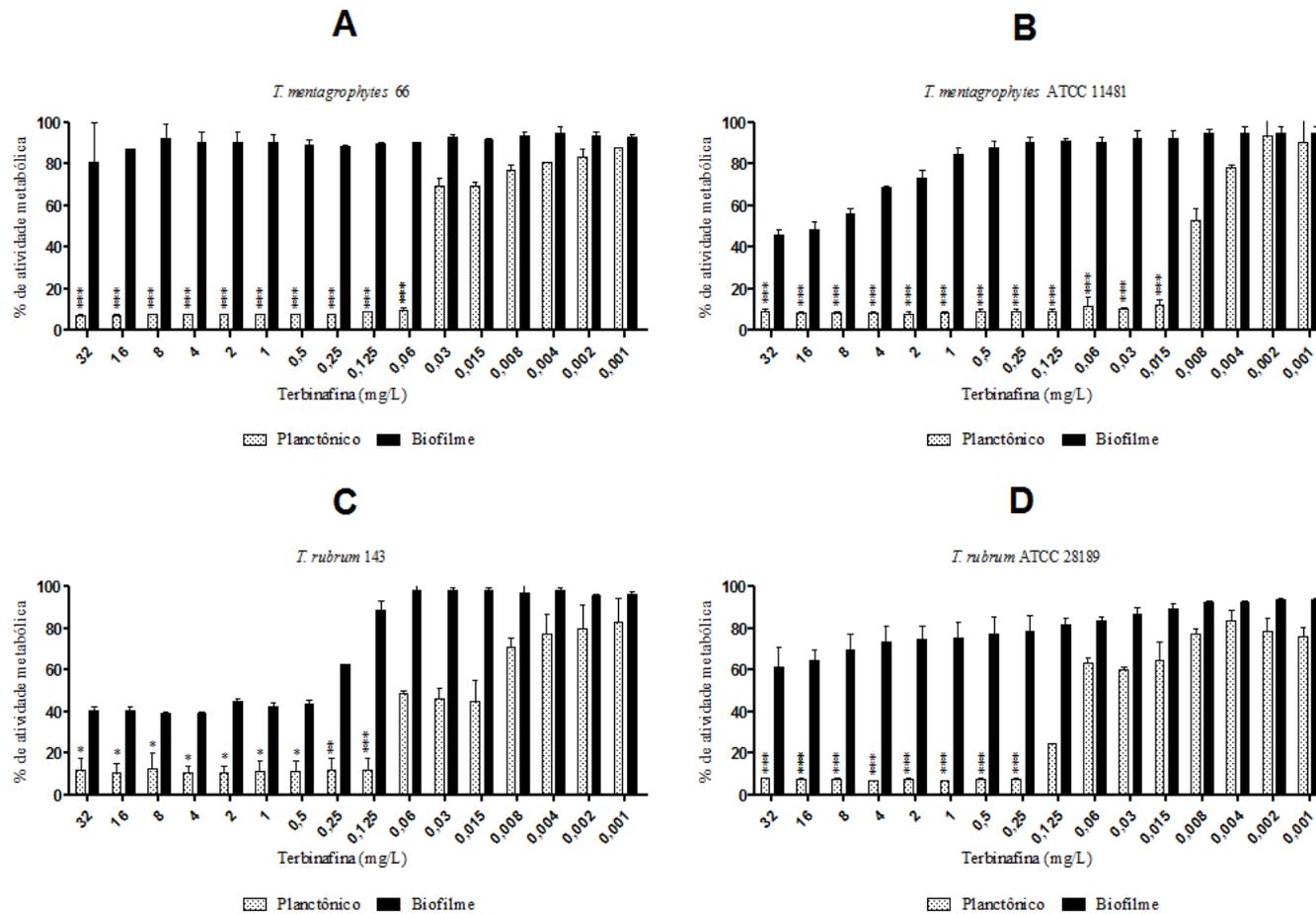
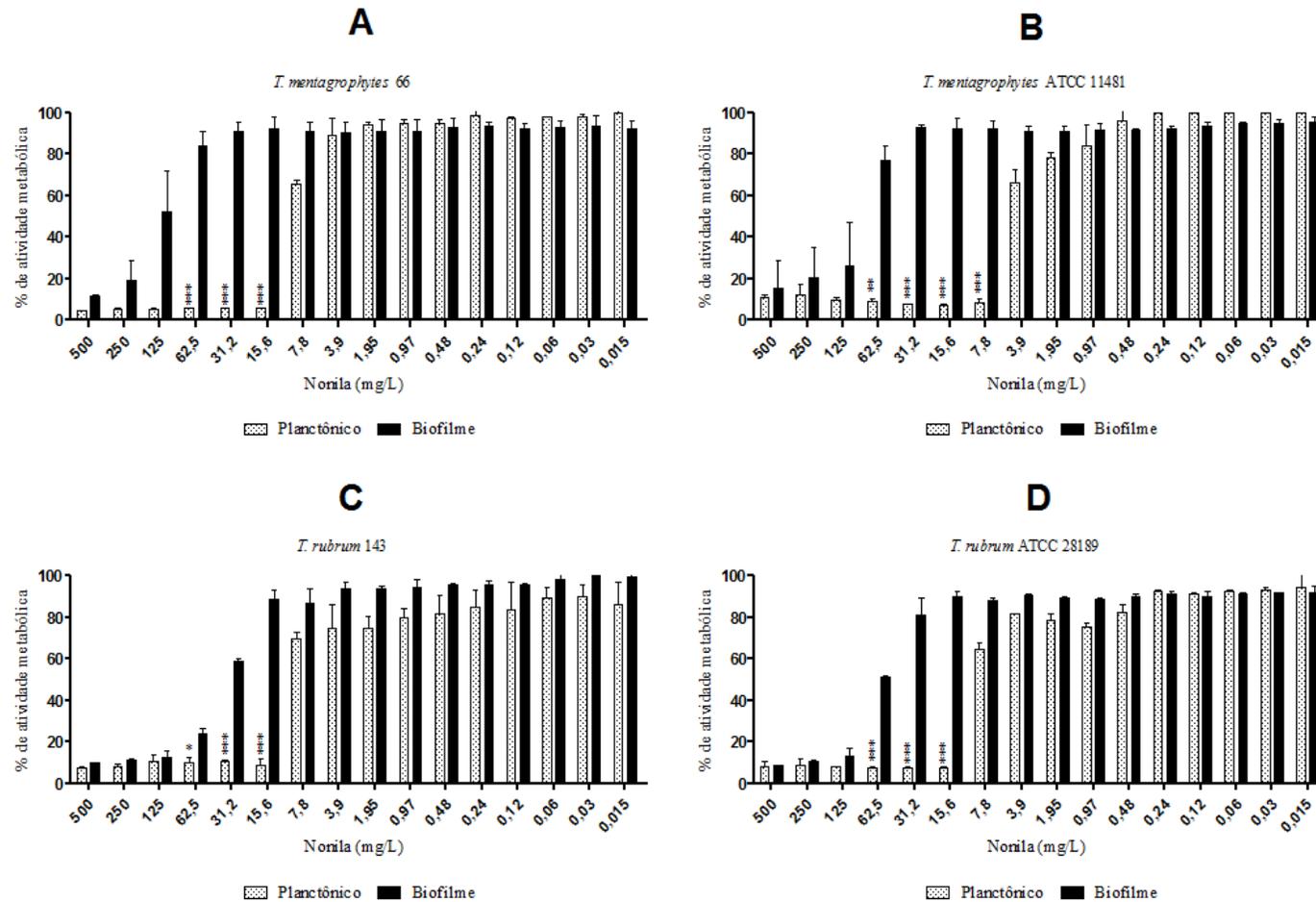


Figura 42. Comparação entre as células planctônicas e em formato biofilme de *Trichophyton* sp., tratados com o protocatuato de nonila. A porcentagem de atividade metabólica for determinada através do ensaio de redução do XTT. Para todas as cepas, as células planctônicas nas concentrações iguais ou acima de 125 mg/L mostraram-se tão sensíveis quanto as células em formato biofilme ($p > 0.05$). Os asteriscos denotam redução significativa (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) da porcentagem de atividade metabólica das células planctônicas em comparação à porcentagem de atividade metabólica dos biofilmes tratados com a mesma concentração do composto.



4.4.9. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biofilmes tratados

Para melhor observação dos danos causados pelos fármacos e pelo composto aos biofilmes dos dermatófitos, foi realizada a microscopia eletrônica de varredura. Os biofilmes foram formados em placas de 24 poços e co-incubados com as soluções de trabalho dos fármacos e do composto derivado do ácido protocatecuico e preparados para a microscopia. Para todas as cepas e isolados clínicos, as concentrações utilizadas foram: 512 mg/L para fluconazol e griseofulvina; 32 mg/L para terbinafina e 250 mg/L para o protocatecuato nonila, de acordo com os resultados dispostos no item 4.4.7.

Na **Fig. 43**, as letras A, B, C e D mostram a topografia do biofilme de *T. rubrum* ATCC 28189 tratado com fluconazol e as letras E, F, G e H mostram o biofilme da mesma cepa tratado com griseofulvina. O fluconazol não causou nenhum dano à estrutura do biofilme; as hifas continuaram intactas e observou-se concentração de matriz extracelular espessa conectando e cobrindo as hifas em toda a extensão do biofilme. Já no biofilme tratado com griseofulvina, é possível visualizar alguns poucos danos através da presença de hifas murchas e com paredes celulares colabadas, porém a maioria das hifas continuaram intactas, circundadas por material polissacarídico. A **Fig. 44** mostra o biofilme do mesmo fungo tratado com terbinafina (A, B, C e D) e o protocatecuato de nonila (E, F, G e H). A terbinafina aparentemente não causou danos às hifas, ao contrário, a grande maioria permaneceu intacta e observou-se uma enorme quantidade de matriz extracelular. Nonila causou danos graves ao biofilme de *T. rubrum* ATCC 28189. É possível observar hifas murchas, pouca presença de matriz extracelular e paredes colabadas em toda a extensão do biofilme.

A **Fig. 45** mostra os biofilmes pré-formados de *T. rubrum* 143 tratados com fluconazol (**A, B, C e D**) e griseofulvina (**E, F, G e H**). O fluconazol não causou danos ao biofilme; as hifas permaneceram intactas e cobertas por uma grande quantidade de matriz extracelular (**Fig. 45B, C e D**). Já no biofilme tratado com a griseofulvina, foram observados danos razoáveis, com algumas hifas murchas se intercalando com as hifas intactas. A matriz extracelular aparentou-se grossa, sem danos e

notou-se uma leve presença de microconídios e arthroconídios, alguns preservados e outros destruídos (**Fig. 45 F e G**). Os biofilmes de *T. rubrum* 143 tratados com terbinafina e nonila são mostrados na **Fig.46. A, B, C e D** representam o biofilme maduro da cepa clínica de *T. rubrum* tratado com terbinafina. Observa-se que a maioria das hifas está destruída no meio de uma minoria intacta. Nota-se uma quantidade muito pequena de material polissacarídico. Assim como na cepa ATCC, o protocatecuato de nonila (**Fig.46 E, F, G e H**) também causou danos graves ao biofilme de *T. rubrum* 143. A grande maioria das hifas mostrou-se destruída, porém ainda se observa a presença de hifas intactas (**Fig.46H**).

Figura 43. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme de *T. rubrum* ATCC 28189 tratado com fluconazol (A, B, C e D) e griseofulvina (E, F, G e H). O Fluconazol não causou nenhum dano à estrutura do biofilme, enquanto a griseofulvina causou danos leves, deixando a maioria das hifas intacta. As setas apontam para a matriz extracelular.

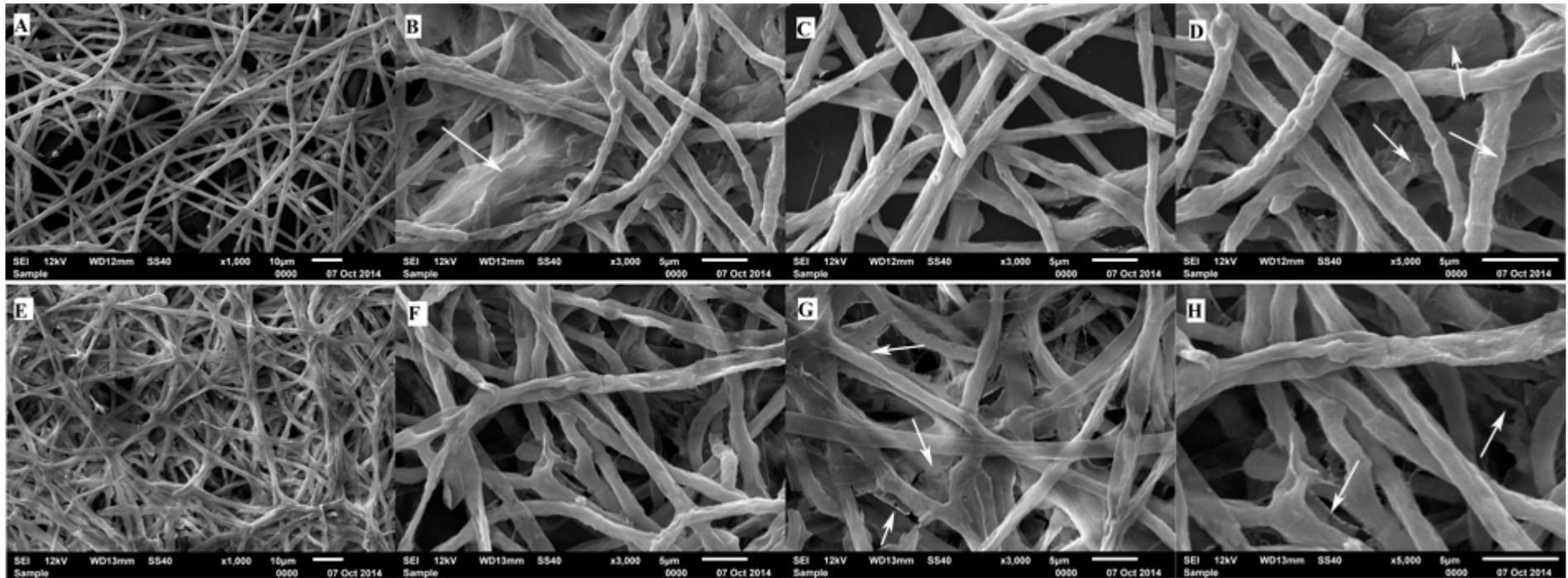


Figura 44. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme de *T. rubrum* ATCC 28189 tratado com terbinafina (A, B, C e D) e nonila (E, F, G e H). A terbinafina aparentemente não causou danos à estrutura do biofilme. Nota-se a presença de uma grande quantidade de matriz extracelular. O protocatecuato de nonila causou danos graves às hifas, com provável extravasamento de conteúdo citoplasmático, colapso das paredes e danos à matriz.

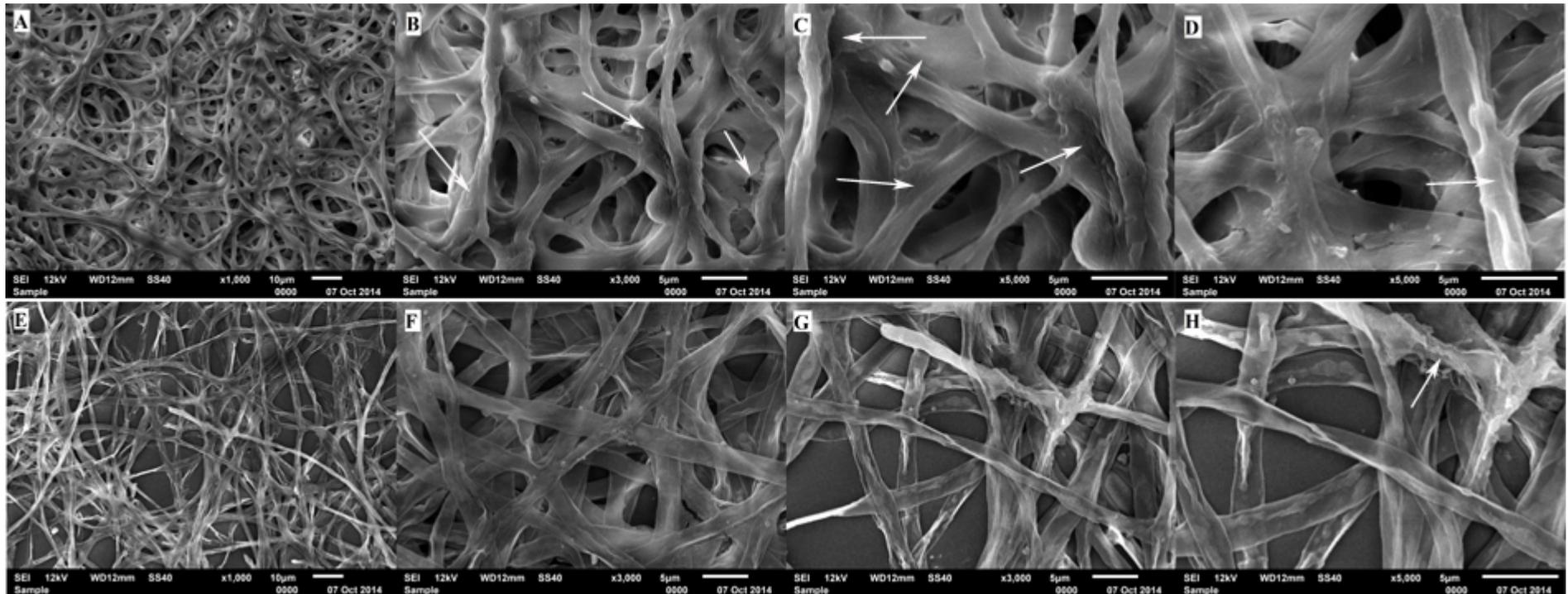


Figura 45. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme de *T. rubrum* 143 tratado com fluconazol (A, B, C e D) e griseofulvina (E, F, G e H). O fluconazol não causou dano ao biofilme; as hifas permaneceram intactas e cobertas por uma quantidade razoável de matriz extracelular. No tratamento com a griseofulvina observam-se danos razoáveis, com hifas murchas se intercalando com hifas intactas. A matriz extracelular apresentou aparência grossa, sem possíveis danos. Notou-se presença de microconídios e artroconídios, alguns preservados e outros destruídos (Fig. 42 F e G).

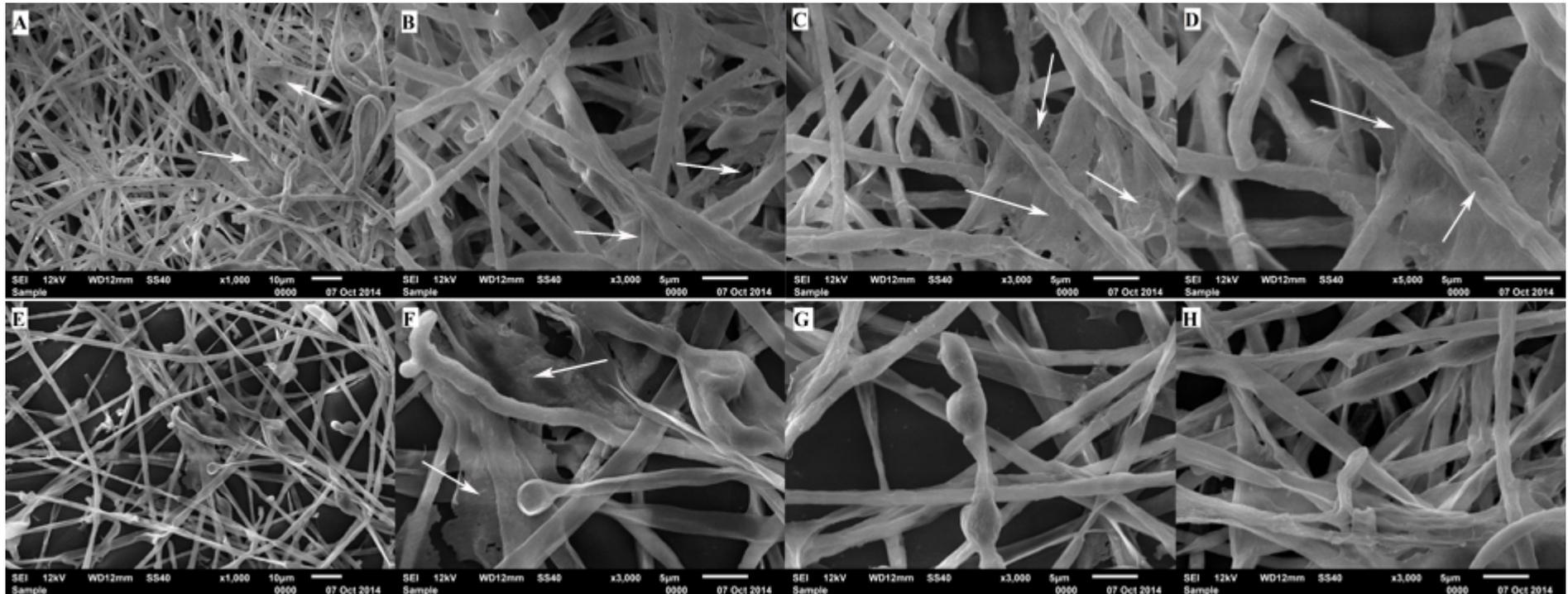
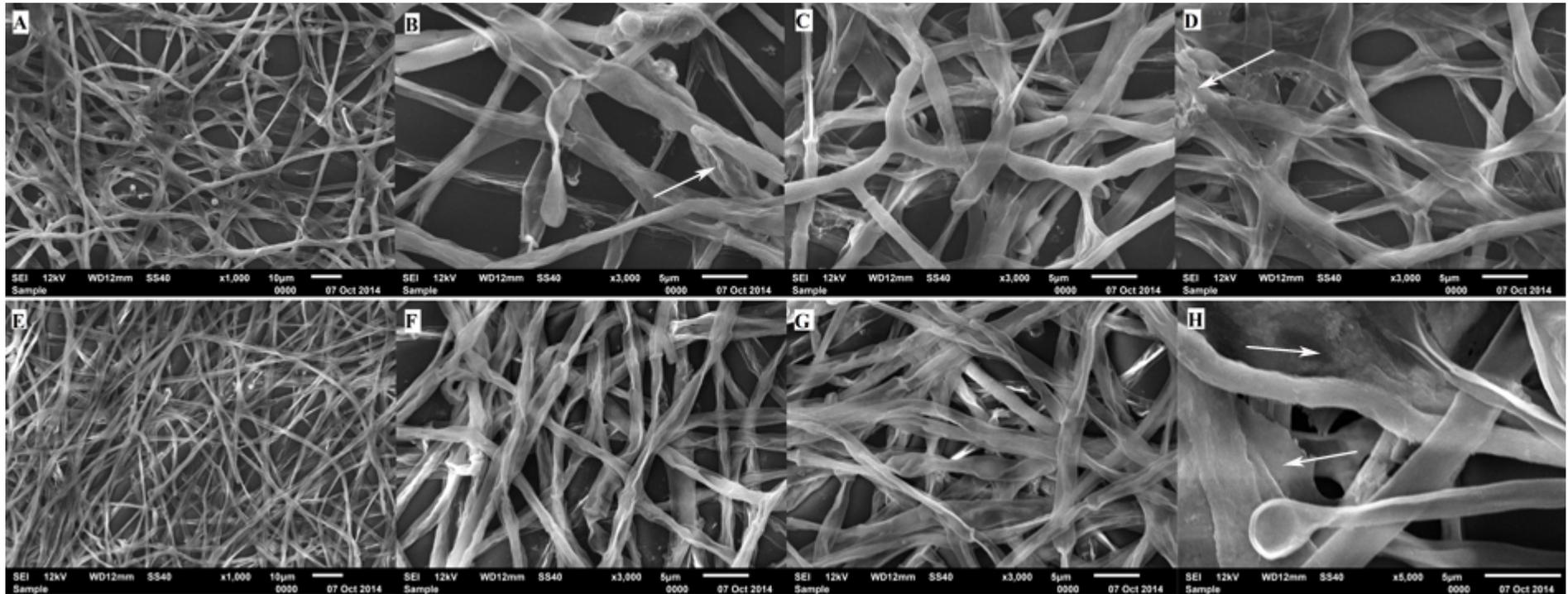


Figura 46. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme de *T. rubrum* 143 tratado com terbinafina (A, B, C e D) e nonila (E, F, G e H). No tratamento com a terbinafina observa-se que a maioria das hifas estão destruídas e uma minoria permanece intacta. Nota-se uma quantidade muito pequena de material polissacarídico. O protocatecuato de nonila também causou danos graves ao biofilme de *T. rubrum* 143 (E, F, G, H). A grande maioria das hifas mostrou-se destruída, porém ainda observa-se a presença de hifas intactas (H).



A **Fig.47** mostra o biofilme maduro de *T. mentagrophytes* ATCC 11481 tratado com fluconazol (**A, B, C, D**) e griseofulvina (**E, F, G, H**). Ambos os fármacos não causaram danos à estrutura dos biofilmes, porém parecem ter estimulado a produção de microconídios. Nota-se a presença de matriz extracelular. A **Fig.48** mostra os biofilmes maduros da mesma cepa após a incubação com terbinafina (**A, B, C, D**) e o protocatecuato de nonila (**E, F, G, H**). Ambos os fármacos causaram danos à estrutura dos biofilmes, porém ainda é possível ver hifas intactas. Nos biofilmes tratados com a nonila ainda podem ser observadas estruturas redondas, pequenas, semelhantes a microconídios atrofiados. No entanto, essas estruturas menores produzidas ao longo da extensão das hifas dos biofilmes também podem ser sugestivas de vesículas extracelulares (VE), principalmente pelo seu tamanho. Essas vesículas podem ter sido secretadas após o estresse provocado pelo contato do composto com o biofilme. A literatura reporta a presença de VE nos sobrenadantes de cultura de fungos como *C. albicans* (Vargas *et al.*, 2015; Wolf *et al.*, 2015), *C. neoformans* (Wolf *et al.*, 2014), *H. capsulatum* (Albuquerque *et al.*, 2008), *P. brasiliensis* (Vallejo *et al.*, 2011) e *Malassezia sympodialis* (Gehrmann *et al.*, 2011). Sabe-se que, nas infecções fúngicas, os mecanismos secretórios têm um papel chave na virulência e que a identificação dessas moléculas associadas a essas vesículas e à secreção é fundamental (Brown *et al.*, 2015; Vargas *et al.*, 2015). Foi reportado que cepas mutantes, com alterações nas vias de secreção, são menos virulentas em modelos murinos de candidíase e também têm alteração na ramificação e na formação de biofilmes (Newport *et al.*, 2003; Thomas, Lopez-Ribot & Lee, 2009; Vargas *et al.*, 2015).

As **Fig.49 e 50** mostram os biofilmes da cepa clínica de *T. mentagrophytes* 66 tratados com fluconazol (**Fig. 49 A, B, C, D**), griseofulvina (**Fig. 49 E, F, G, H**), terbinafina (**Fig. 50 A, B, C, D**) e nonila (**Fig. 50 E, F, G, H**), respectivamente. Era esperado que o fluconazol não causasse danos aos biofilmes de *T. mentagrophytes* 66, porém, **Fig.49D**, é possível ver algumas poucas hifas murchas e com as paredes celulares colabadas. Nota-se também a presença de raros artrosporos. Quando em contato com a griseofulvina, poucos danos são notados, porém observa-se produção de inúmeros

artrosporos ao longo de toda a extensão do biofilme, semelhantes a um cacho de uva (**Fig.49 F e H**). Sabe-se que os artrosporos são formados pela fragmentação da hifa durante o cultivo prolongado, diferente dos microconídios, que aparecem no final dos conidióforos, que são formados nas laterais das hifas. Já os artroconídios são definidos como uma desarticulação geneticamente programada do septo da hifa formando artrosporos de cadeia curta, de forma esférica ou oval. Além disso, eles são células metabolicamente ativas, ricas de vacúolos lipídicos e organelas intracelulares e são resistentes a alguns antifúngicos, como a griseofulvina, e a condições adversas do ambiente (Coelho *et al.*, 2008). Já é reportada na literatura a capacidade que os esporos de *T. mentagrophytes* têm de permanecerem viáveis quando expostos a diferentes concentrações de alguns antifúngicos como clotrimazol, griseofulvina, nitrato de miconazol e nistatina (Hashimoto & Blumenthal, 1978).

Na **Fig.50** é possível notar poucos danos causados pela terbinafina (**A, B, C e D**) ao biofilme de *T. mentagrophytes* 66. As hifas danificadas são melhor notadas nas **Fig. 50C e D**. Também nestas é possível ver artroconídios se diferenciando em artrosporos. Por fim, as **Fig. 50 E, F, G e H**, mostram os biofilmes dessa mesma cepa tratados com o protocatecuato de nonila, que foi o único agente capaz de danificar os biofilmes dessa linhagem. Nas figuras **F, G e H** observamos uma destruição total das hifas, indicando que houve extravasamento de material intracelular, resultando em colapamento das paredes celulares. A grande maioria dos resultados da MEV foi concordante com os resultados obtidos no item 4.4.7, nas mesmas concentrações de testadas.

Figura 47. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme de *T. mentagrophytes* ATCC 11481 tratado com fluconazol (A, B, C e D) e griseofulvina (E, F, G e H). Os fármacos não causaram danos à estrutura dos biofilmes, porém parecem ter estimulado a produção de microconídios. As setas denotam a presença de matriz extracelular.

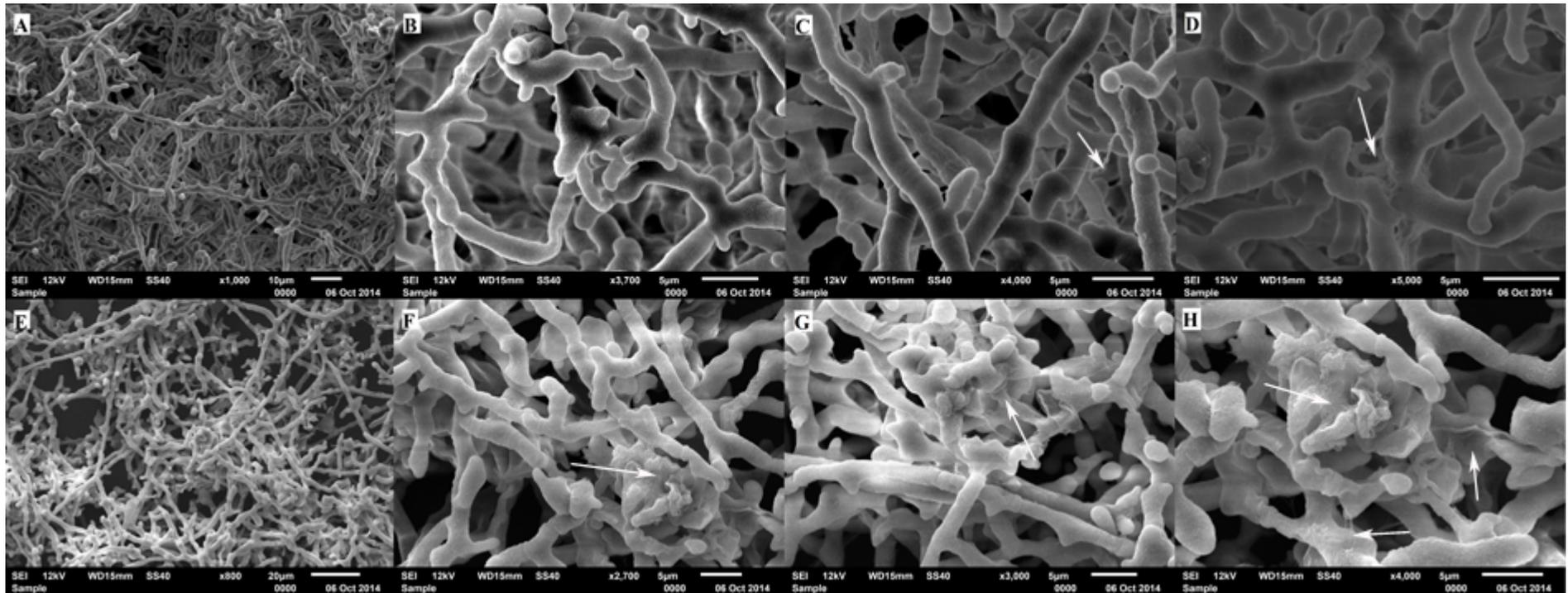


Figura 48. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme de *T. mentagrophytes* ATCC 11481 tratado com terbinafina (A, B, C e D) e nonila (E, F, G e H). Ambos causaram danos à estrutura dos biofilmes, porém ainda é possível observar estruturas intactas. No biofilme tratado com a nonila também foram observadas estruturas redondas, semelhantes microconídios atrofiados (seta amarela). As setas brancas apontam para a matriz extracelular.

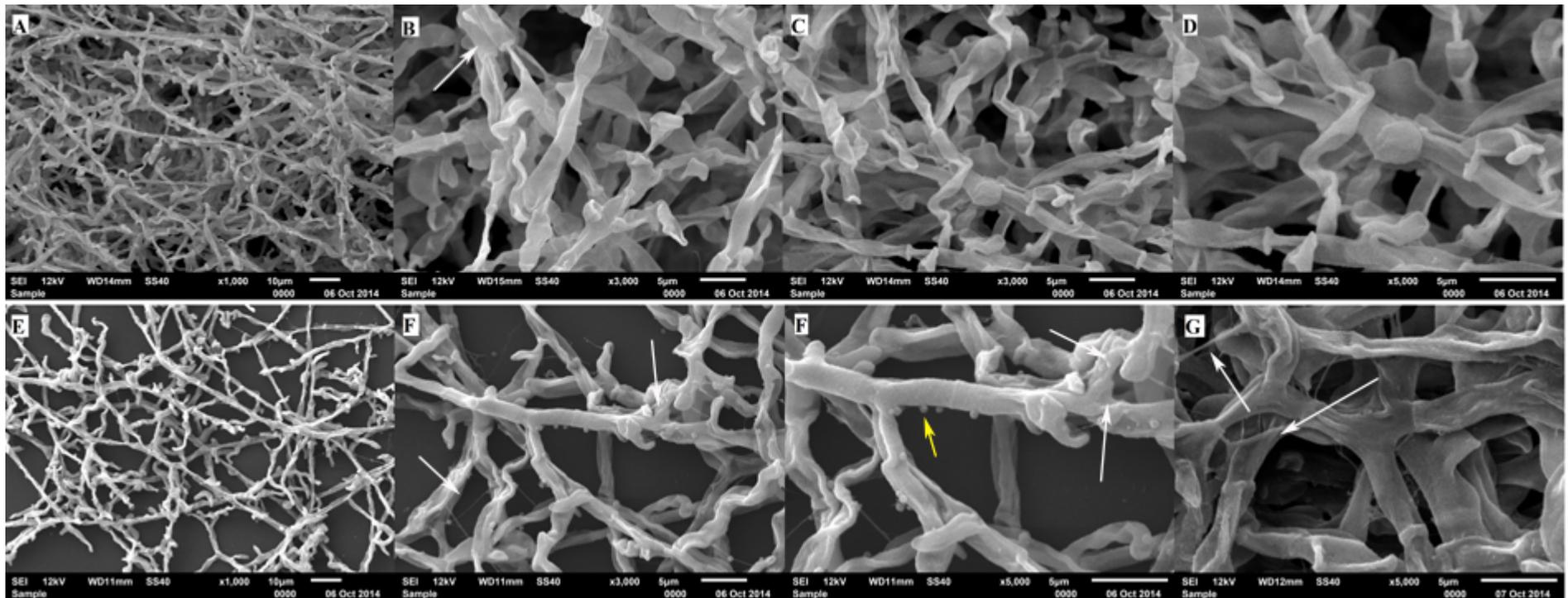


Figura 49. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme de *T. mentagrophytes* 66 tratado com fluconazol (A, B, C e D) e griseofulvina (E, F, G e H). Era esperado que o fluconazol não causasse danos aos biofilmes de *T. mentagrophytes* 66, porém, a Fig. 46D, mostra algumas poucas hifas murchas e com as paredes celulares colabadas. Nota-se também a presença de raros artrosporos. Quando em contato com a griseofulvina, poucos danos são notados, porém observa-se produção do que parece ser inúmeros artrosporos ao longo de toda a extensão do biofilme, semelhantes a um cacho de uva (Fig.46F e H).

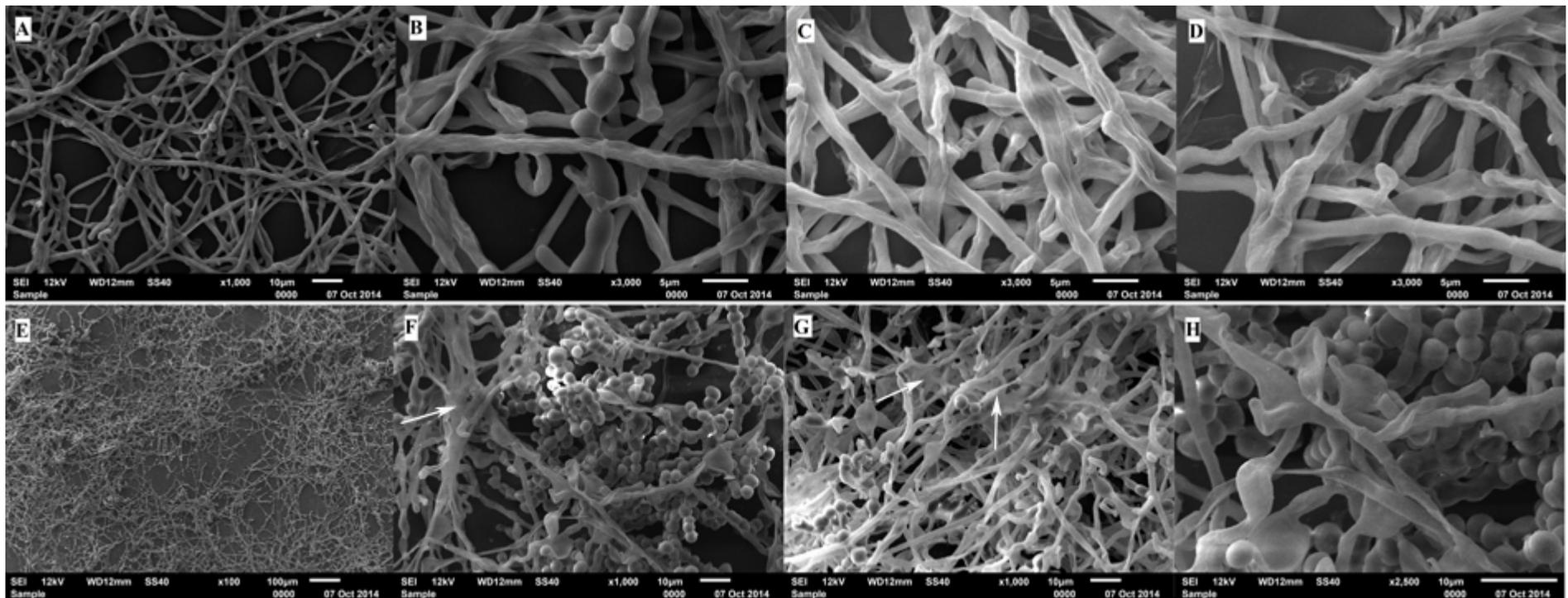
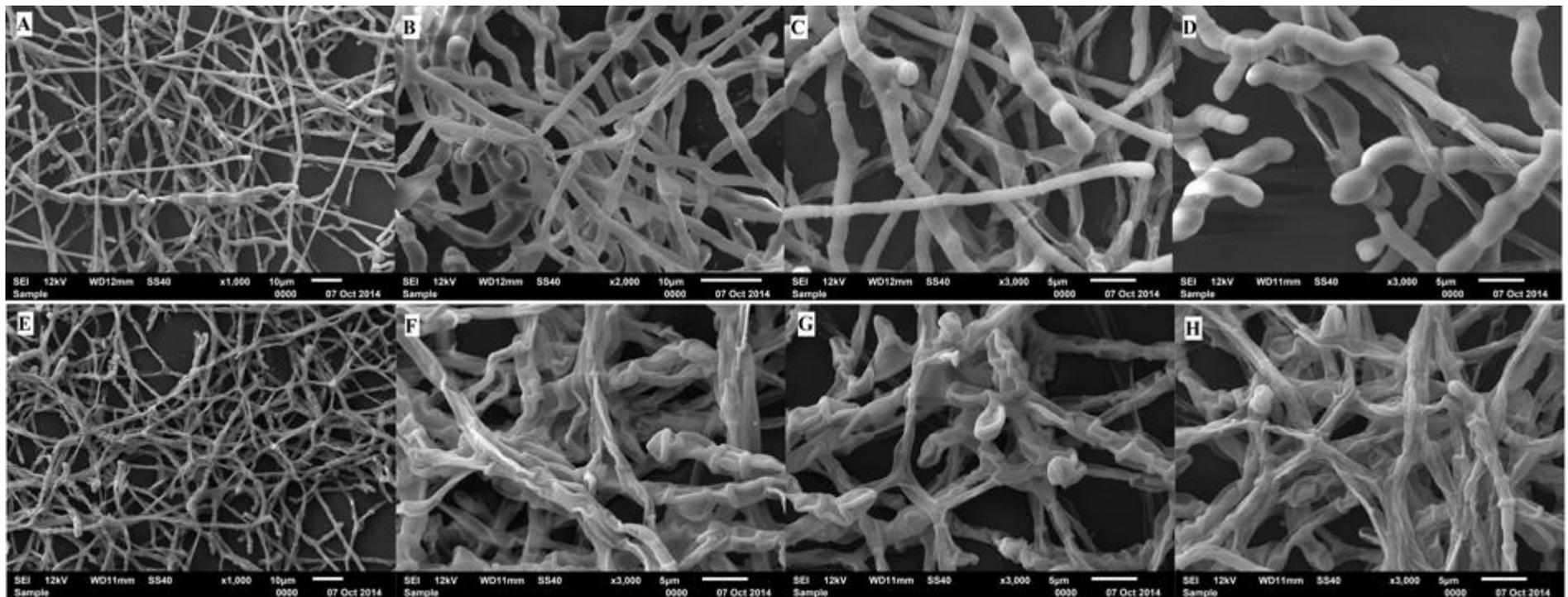


Figura 50. Microscopia eletrônica de varredura do biofilme de *T. mentagrophytes* 66 tratado com terbinafina (A, B, C e D) e nonila (E, F, G e H). Nessa figura é possível notar poucos danos causados pela terbinafina (A, B, C e D) ao biofilme de *T. mentagrophytes* 66. As hifas danificadas são mais bem notadas em C e D. Também nestas, é possível observar alguns artroconídios se diferenciando em artrosporos. E, F, G e H, mostram os biofilmes da mesma cepa tratados com o protocatecuato de nonila, o único agente capaz de danificar os biofilmes dessa linhagem. Nas figuras F, G e H observamos uma destruição total das hifas, indicando que houve extravasamento de material intracelular, resultando em colapso das paredes celulares.



4.4.10. Microscopia confocal de varredura a laser dos biofilmes pré-formados tratados

A terbinafina foi o antifúngico que teve melhor ação sobre os biofilmes entre todos os fármacos testados, pois apesar de não tê-los destruído, em algumas cepas causou diminuição significativa da atividade metabólica quando comparadas aos controles positivos (não tratados). Já o protococatecuato de nonila mostrou excelente atividade contra os biofilmes pré-formados, sendo assim, a microscopia confocal dos biofilmes tratados com este composto e com terbinafina foi realizada, a fim de verificar a possível influência desses na espessura dos biofilmes. As **Fig. 51 e 52** mostram os cortes ortogonais, em 3D, na magnificação de 40X, indicando as espessuras dos biofilmes pré-formados, corados com FUN 1 e Concanavalina A. Diante dos resultados apresentados, os tratamentos causaram diminuição das espessuras dos biofilmes formados por *T. mentagrophytes* 66, *T. mentagrophytes* ATCC 11481 e *T. rubrum* ATCC 28189, porém não diminuíram a espessura dos biofilmes formados por *T. rubrum* 143.

A microscopia confocal também foi realizada com o objetivo de verificar a existência de regiões com alta atividade metabólica nos biofilmes tratados. A **Fig. 53** apresenta imagens em diferentes magnificações (40X, 60X e 100X) dos biofilmes pré-formados de *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*, tratados com terbinafina e nonila. De maneira geral, em todos os biofilmes tratados houve a presença de regiões com células viáveis, sendo assim, nenhum biofilme tratado com a terbinafina e, principalmente com a nonila, apresentou 100% de morte celular. A quantidade de células viáveis dependeu da cepa e do tratamento.

Figura 51. Cortes ortogonais em 3D, indicando a espessura dos biofilmes de *T. mentagrophytes* com e sem tratamento. A, B e C representam os biofilmes de *T. mentagrophytes* 66 sem tratamento, tratados com terbinafina e nonila e com espessuras de 60,55; 30,21 e 39,28 μm , respectivamente. D, E e F indicam os biofilmes de *T. mentagrophytes* ATCC não tratados (60,42 μm), tratados com terbinafina (41,29 μm) e nonila (25,18 μm). Para as duas cepas de *T. mentagrophytes*, os tratamentos com ambos os fármacos causaram diminuição na espessura dos biofilmes.

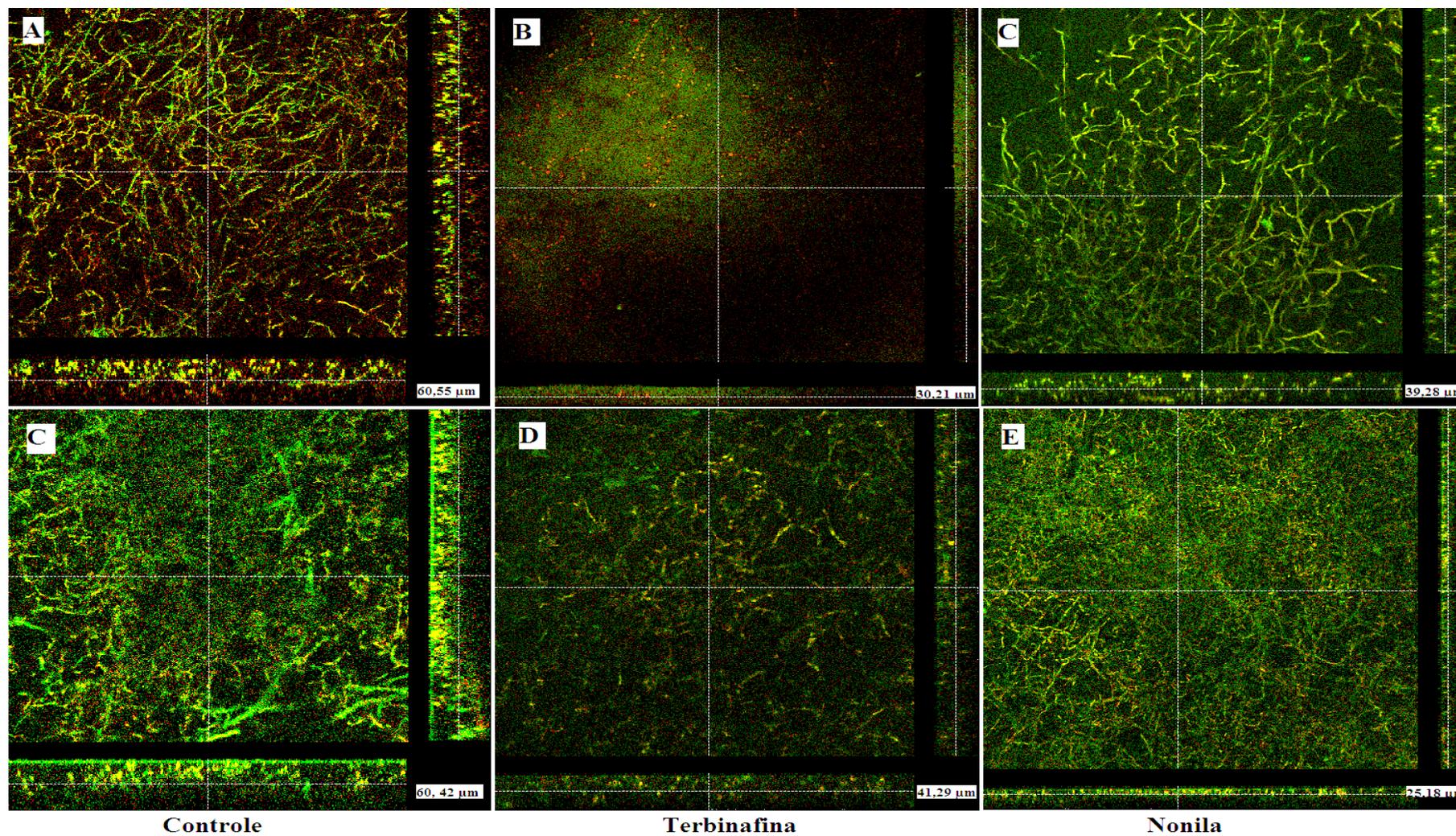


Figura 52. Cortes ortogonais em 3D, indicando a espessura dos biofilmes de *T. rubrum* com e sem tratamento. A, B e C representam os biofilmes de *T. rubrum* 143 sem tratamento; tratados com terbinafina e nonila e com espessuras de 40,28; 41,32 e 40,28 μm , respectivamente. D, E e F indicam os biofilmes de *T. rubrum* ATCC não tratados (94,67 μm), tratados com terbinafina (33,23 μm) e com nonila (39,28 μm). Os tratamentos com ambos os fármacos causaram diminuição apenas na espessura dos biofilmes de *T. rubrum* ATCC 28189. Para a *T. rubrum* 143 não houve redução

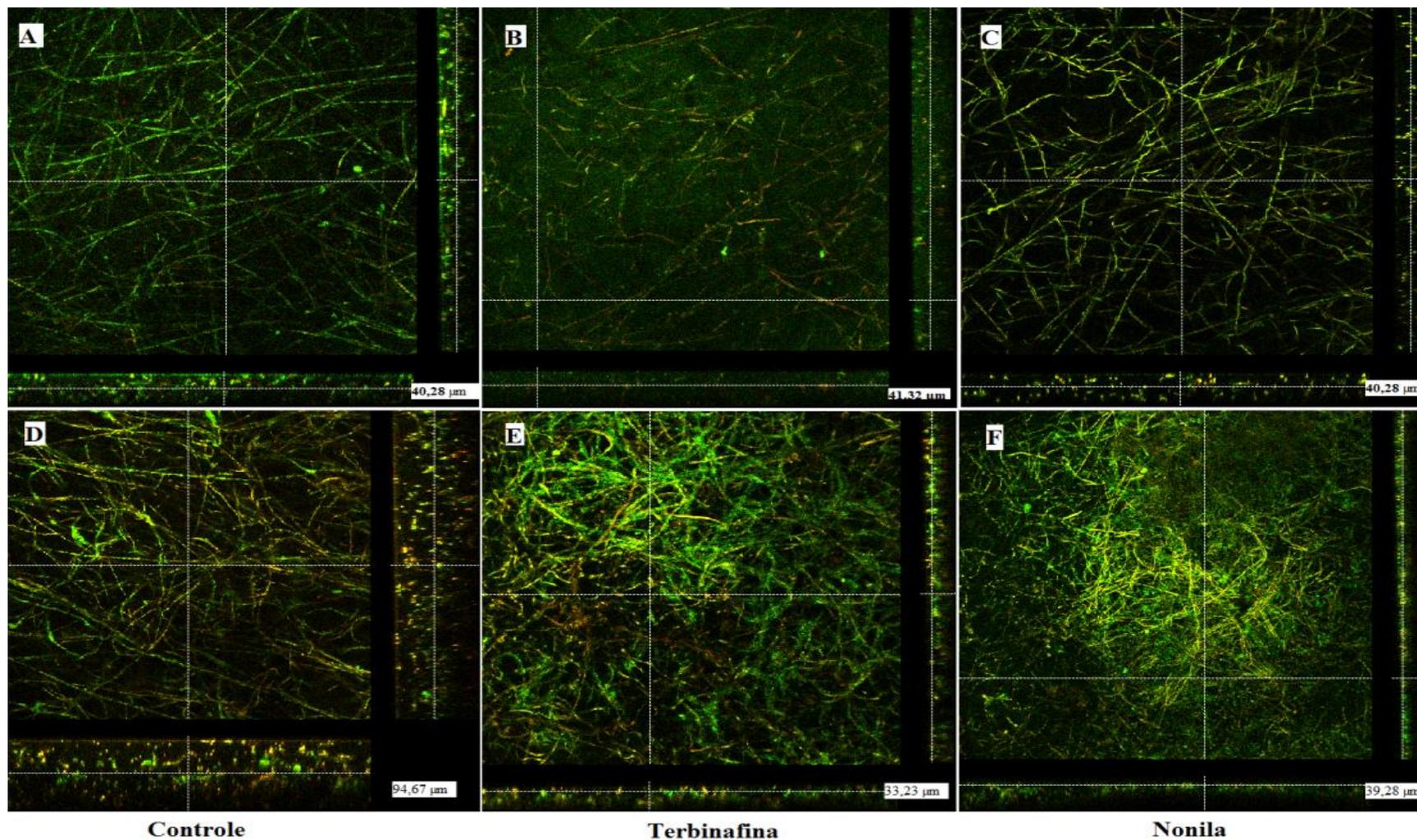
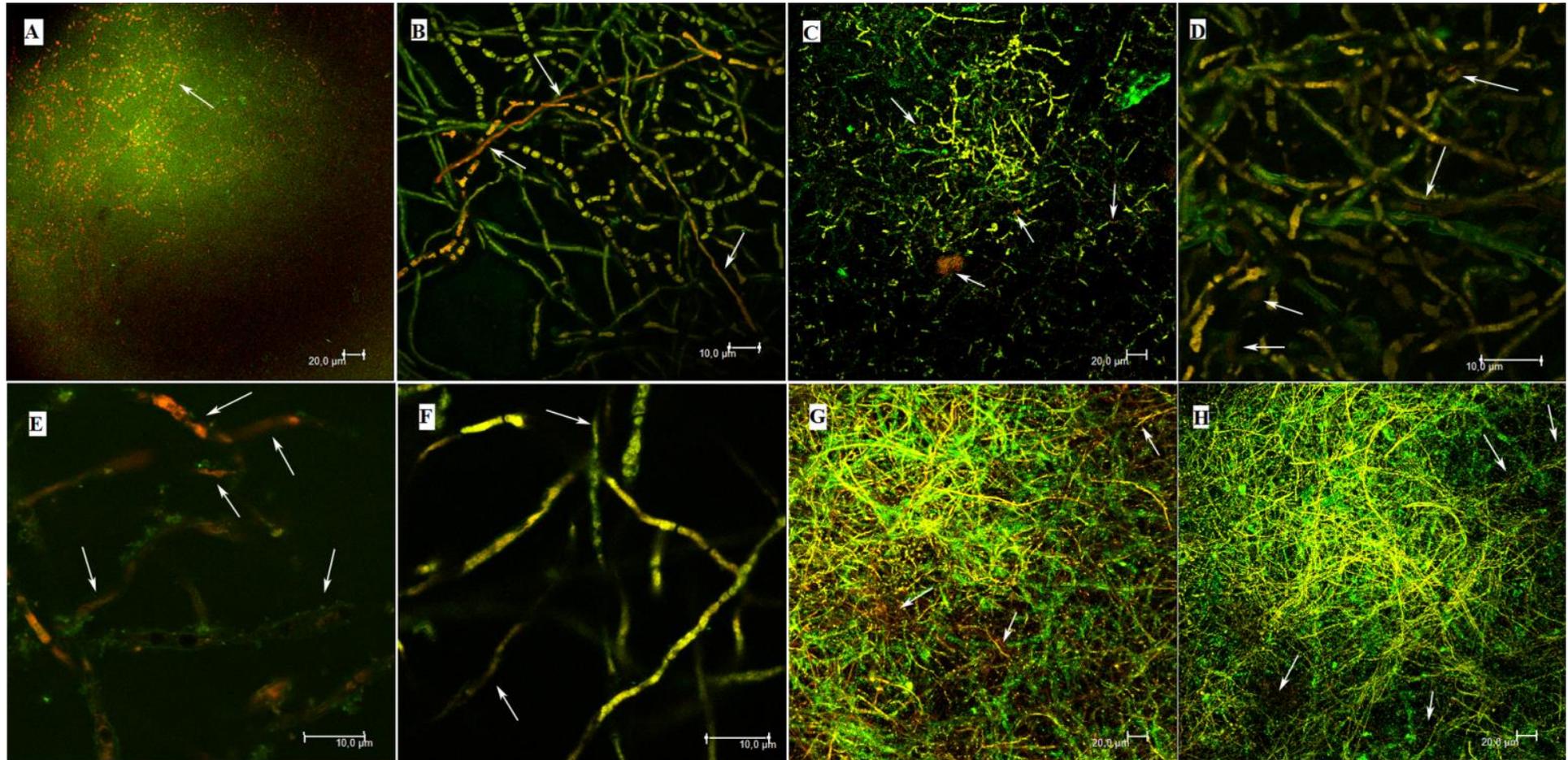


Figura 53. Microscopia confocal dos biofilmes tratados em diferentes magnificações. A representa o biofilme de *T. mentagrophytes* 66 tratado com terbinafina na magnificação de 40X, enquanto B representa o biofilme da mesma cepa tratado com nonila, na magnificação de 60X. C representa o biofilme de *T. mentagrophytes* ATCC 11481 tratado com terbinafina (40X) e D representa o mesmo biofilme tratado com nonila, na magnificação de 100X. E e F mostram os biofilmes de *T. rubrum* 143 tratados com terbinafina e nonila, respectivamente (100X), enquanto G e H mostram os biofilmes pré-formados de *T. rubrum* ATCC 28189 tratados com terbinafina e nonila. As setas apontam regiões com a presença de células viáveis. Todos os biofilmes tratados apresentaram regiões com atividade metabólica, sendo assim, nenhum dos fármacos e compostos testados causou 100% de morte celular.



O conceito de biofilmes é bem suportado na literatura ao tratar-se de bactérias e leveduras. No entanto, os fungos filamentosos também são capazes de formar biofilmes. Somente alguns relatos sobre biofilmes de fungos filamentosos são encontrados na literatura (Mowat *et al.*, 2007; Mowat *et al.*, 2009; Machado Vila, Sousa Quintanilha & Rozental, 2015; Nazik *et al.*, 2015; Perdoni *et al.*, 2015; Vila, Rozental & De Sa Guimaraes, 2015). De acordo com Harding e colaboradores (2009) a explicação para o pouco número de relatos deve-se ao fato dos fungos filamentosos não se encaixarem, como as leveduras, nas definições restritivas de biofilmes baseados nos modelos bacterianos e, devido a isso, foram propostos novos critérios que expandem os conceitos sobre os biofilmes.

Na investigação da resistência dos biofilmes fúngicos, atualmente é utilizado o método colorimétrico do XTT, que mede a atividade metabólica coletiva das células em formato de biofilme. É considerado um método não invasivo para a comunidade de microrganismos, além de requerer um mínimo de pós processamento quando comparado a outros métodos (Pierce *et al.*, 2008; Ramage *et al.*, 2012).

Sabe-se que várias espécies de fungos que formam biofilmes são mais resistentes aos antifúngicos (Fanning & Mitchell, 2012). A resistência dos biofilmes fúngicos é multifacetada e envolve barreiras físicas, bem como alguns processos regulatórios complexos, sendo assim, diferentes mecanismos de resistência são utilizados dependendo da fase de desenvolvimento do biofilme (Ramage *et al.*, 2012). As bombas de efluxo são utilizadas durante a fase inicial até a fase intermediária de desenvolvimento e são abandonadas quando a matriz extracelular se forma para dificultar e reter a penetração do antimicrobiano na estrutura do biofilme. Além disso, a densidade do biofilme maduro também pode agir como barreira física, beneficiando a comunidade de microrganismos. Nos biofilmes formados por fungos filamentosos, durante o crescimento das hifas a biossíntese do ergosterol é regulada pelo tratamento antifúngico. Nos biofilmes mais densos, onde a penetração dos fármacos é possível, as células persistentes garantem a sobrevivência através da ação de proteínas de estresse global, que garantem a proteção e a manutenção dos biofilmes (Ramage *et al.*, 2012).

Nesse trabalho, três fármacos (fluconazol, griseofulvina e terbinafina) e o composto derivado do ácido protocatecuico com melhor índice de seletividade (nonila) foram testados quanto à capacidade de prevenir o crescimento das células planctônicas e de destruir os biofilmes pré-formados. Os fármacos antifúngicos testadas foram mais efetivos contra as células planctônicas do que contra os biofilmes de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*; o protocatecuato de nonila apresentou atividade potente para ambos os formatos, porém apresentou-se tóxico para as células humanas nessas concentrações. A capacidade de resistência dos biofilmes pode explicar a infecção persistente, as recidivas e o tratamento longo que é requerido nas dermatofitoses, especialmente nas onicomicoses. Sendo assim a caracterização dos biofilmes formados por esses patógenos é uma ferramenta de extrema importância para a possível revisão das doses dos antifúngicos e do tempo de tratamento, assim como para a descoberta de novos alvos para novos fármacos antifúngicos.

4.5. ATIVIDADE *in vitro* DA COMBINAÇÃO ENTRE TERBINAFINA E O PROTOCATECUATO DE NONILA CONTRA *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*

Entre os fármacos testados contra os biofilmes, a terbinafina foi o que melhor conseguiu reduzir a porcentagem de atividade metabólica, causando danos em alguns biofilmes de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*. Tendo em vista que o protocatecuato de nonila foi potente tanto para as células planctônicas, quanto para as em formato de biofilme, é interessante a verificação da interação entre esse fármaco e o composto. Sendo assim, essa interação foi testada inicialmente nas células planctônicas. Os resultados da combinação entre terbinafina e o protocatecuato de nonila contra duas cepas ATCC de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* estão dispostos na **Tabela 5**. Os valores de ICIF sugerem que a combinação entre o fármaco e o composto tem uma interação indiferente tanto para *T. rubrum* quanto para *T. mentagrophytes*. Nota-se ainda, que apesar disso, a combinação reduziu em 60 vezes o valor de CIM da terbinafina, porém aumentou em duas vezes o valor de CIM da nonila, quando comparados aos CIM's do fármaco e do composto sozinhos em *T. rubrum* ATCC 28189. Já na cepa de *T. mentagrophytes* ATCC 11481, o valor de CIM da terbinafina em combinação permaneceu o

mesmo que o CIM do fármaco sozinho; no entanto, o CIM da nonila em combinação foi reduzido quatro vezes quando comparado ao valor de concentração inibitória mínima do composto sozinho.

Para este teste não foi possível realizar a análise estatística, uma vez que foi feito apenas um experimento independente em duplicata, com resultados semelhantes. É necessário realizar mais replicatas, bem como testar com outras cepas ATCC e isolados clínicos, para que se comprove a indiferença da combinação.

Os protocatecuatos de pentila, hexila, heptila, octila e nonila foram testados em combinação com o fluconazol contra cepas ATCC e isolados clínicos de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* por Soares e colaboradores (2014). Apenas a combinação entre nonila e fluconazol produziu efeito sinérgico contra um isolado clínico de *T. mentagrophytes*. Nos demais dermatófitos testados, a combinação entre nonila e terbinafina produziu efeito indiferente (aditivo). Os demais derivados do ácido protocatecuico quando em combinação com o mesmo fármaco produziram interações indiferentes, corroborando com os resultados do presente trabalho.

Tabela 5. Interação entre terbinafina e o protocatecuato de nonila contra *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*

Microrganismo	CIM (mg/L)			ICIF
	T	N	T / N	
Tr ATCC 28189	0,06	2	0,001 / 4	2
Tm ATCC 11481	0,06	4	0,06 / 1	1,25

CIM = Concentração inibitória mínima; *ICIF* = índice de concentração inibitória fracionada; *T* = Terbinafina; *N* = Nonila; *T/N* = Terbinafina em combinação com a nonila; *Tr* = *T. rubrum*; *Tm* = *T. mentagrophytes*.

Diversos estudos têm testado *in vitro* a terbinafina sozinha e em combinação contra várias espécies fúngicas. Li, Wan & Li (2014) verificaram uma interação sinérgica da terbinafina em combinação com o itraconazol contra *Phialophora verrucosa*, fungo agente da cromoblastomicose. Simonetti e colaboradores (2014) testaram a combinação entre o peptídeo IB-367 e os fármacos fluconazol, itraconazol e terbinafina contra *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *M. canis*. A combinação reduziu os valores de CIM da terbinafina e do itraconazol; além disso, houve sinergismo em 25% dos dermatófitos testados com a combinação IB-367/Terbinafina. Nyilasi e colaboradores (2014) investigaram o efeito da combinação entre estatinas e diversos antifúngicos comerciais contra *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis* e *M. gypseum*. As combinações entre sinvastatina e cetoconazol e sinvastatina e terbinafina foram ativas para todos os dermatófitos testados, apresentando um efeito sinérgico contra todos os isolados clínicos. Biancalana e colaboradores (2011) verificaram a interação entre a terbinafina e anfotericina B, itraconazol e voriconazol contra hifas e conídios de fungos demáceos. Os resultados mostraram 100% de interações sinérgicas entre a terbinafina, os azóis e a anfotericina B.

A combinação entre dois ou mais fármacos tem suas vantagens e desvantagens. Essa interação pode resultar em aumento da eficácia, amplo espectro de atividade e melhor tolerância do paciente (Santos & Hamdan, 2006), contudo, não é tão simples como parece. A combinação de terapias antifúngicas também pode reduzir a capacidade antimicrobiana e a eficácia clínica, além de aumentar o potencial para interação entre fármacos e toxicidade, sendo assim, é importante avaliar criticamente o papel da terapia em combinação (Johnson *et al.*, 2004).

Parte II: Avaliação in vitro da atividade antifúngica de nanopartículas de óxido nítrico e do efinaconazol (Jublia[®]) contra células planctônicas e biofilmes de T. rubrum.

Objetivos
(Parte II)

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GERAL

Verificar o potencial antifúngico *in vitro* de nanopartículas de óxido nítrico (NO-np) e de efinaconazol a 10% (Jublia[®]) contra as formas planctônicas e biofilmes de *T. rubrum*.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a susceptibilidade de nanopartículas de óxido nítrico (NO-np) e de Efinaconazol (Jublia[®]) contra a cepa ATCC MYA-4438 e um isolado clínico de *T. rubrum*, utilizando como controle os fármacos terbinafina e fluconazol;
- Avaliar o efeito da combinação entre NO-np, terbinafina e efinaconazol em células planctônicas de *T. rubrum* e verificar os possíveis danos nos microconídios e nas hifas através de microscopia de transmissão;
- Verificar a citotoxicidade das nanopartículas de óxido nítrico em linhagens celulares HaCat (queratinócitos de pele humana);
- Caracterizar a formação de biofilmes pela cepa ATCC MYA-4438 e pelo isolado clínico de *T. rubrum*;
- Avaliar a sensibilidade *in vitro* das nanopartículas de óxido nítrico, efinaconazol, fluconazol e terbinafina contra as células planctônicas e biofilmes de *T. rubrum*.

Material e Métodos
(Parte II)

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. AMOSTRAGEM

Na segunda parte desse trabalho, foi utilizada a cepa de *T. rubrum* ATCC MYA-4438, gentilmente cedida pelo Dr. Mahmoud Ghannoum, da *Case Western Reserve University de Cleveland, Ohio*, Estados Unidos e um isolado clínico proveniente de um paciente do Montefiore Medical Center, *Bronx, NY*, EUA e pertencente à coleção do laboratório do Prof. Dr. Joshua Nosanchuk, do Departamento de Doenças Infecciosas da *Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York*, EUA.

6.2. CULTIVO

Todas as amostras foram mantidas em ágar Sabouraud dextrose (DIFCO), acrescido de cloranfenicol a 0,1% e incubadas à temperatura de 28°C por até 15 dias (Costa-Orlandi *et al.*, 2012).

6.3. OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO NÍTRICO (NO-np)

As nanopartículas foram sintetizadas em colaboração com o grupo de pesquisa do Dr. Joel M. Friedman e Dr. Adam Friedman, dos Departamentos de Fisiologia e Biofísica e Nanodermatologia da Albert Einstein College of Medicine, da Yeshiva University. Em resumo, um composto de hidrogel de silano foi sintetizado utilizando uma mistura de tetrametilortosilano (TMOS) (*Sigma-Aldrich*), ácido clorídrico (HCl) 1mM, polietilenoglicol, quitosana, glicose e nitrito de sódio em 0.5 mM de tampão fosfato de sódio (pH=7). O nitrito foi reduzido dentro da matriz com os elétrons gerados termicamente a partir da glicose. Após a reação de redox, os ingredientes foram combinados e secos com o auxílio de um liofilizador, resultando em um pó fino composto por nanopartículas contendo óxido nítrico. As NO-np permanecem estáveis nesta forma por mais de 1 ano à temperatura ambiente. Uma vez expostas a

um ambiente aquoso, as propriedades do composto de hidrogel permitem a abertura dos canais de água no interior das partículas, facilitando a liberação do óxido nítrico retido durante períodos de tempo prolongados. Como controle, também foram sintetizadas nanopartículas sem a adição de óxido nítrico (np) (Friedman *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2009; Macherla *et al.*, 2012).

6.4. AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE *T. rubrum* AOS ANTIFÚNGICOS E ÀS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO NÍTRICO PELA TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO

6.4.1. Diluição dos fármacos

Os fármacos fluconazol (*Pfizer*) e terbinafina (*Sigma-Aldrich*) foram preparados de acordo com o preconizado no documento M38-A2, proposto pelo CLSI (2008a), com algumas modificações. Em resumo, foram preparadas soluções-estoque em tubos *Falcon* de 15 mL e, a partir destas, soluções-trabalho, considerando as suas purezas. Para o teste de sensibilidade, o fluconazol e a terbinafina foram testados nos intervalos de concentração correspondentes a 64 - 0,125 mg/L e 0,5 - 0,001 mg/L, respectivamente. O Efinaconazol em solução tópica a 10% (*Jublia*®), foi cedido pela *Valeant Pharmaceuticals International, Inc.* As soluções-trabalho foram preparadas em meio RPMI, a partir da solução estoque a 10% e inicialmente testadas no intervalo de concentração correspondente a 0,5 - 0,001 mg/L.

6.4.2. Diluição das nanopartículas

As nanopartículas de óxido nítrico e controle foram pesadas assepticamente, diluídas diretamente no meio RPMI 1640 e solubilizadas com o auxílio de um sonicador de sonda (10 segundos) e vórtex por 2 minutos, de modo a obter uma solução trabalho inicial de 40 mg/mL. Em seguida foram realizadas diluições seriadas até que a concentração final fosse de 0,04 mg/L.

6.4.3. Preparo do inóculo

O preparo do inóculo foi realizado conforme descrito no item 3.5.3, com modificações. Em resumo, a cepa e o isolado clínico de *T. rubrum* foram cultivados em ágar batata dextrose (*Difco, BD biosciences*) e incubados à temperatura de 28°C por sete dias ou até que houvesse esporulação. Uma suspensão de conídios foi preparada cobrindo as culturas com solução salina estéril. Os conídios foram contados no hematocítômetro e os inóculos foram preparados em meio RPMI-1640, de modo a atingir uma concentração final na placa de microdiluição correspondente a $2,5 \times 10^3$ células/mL.

6.4.4. Montagem das placas

Cem microlitros de cada diluição dos antifúngicos e das nanopartículas foram distribuídos nas placas de 96 poços, juntamente aos seus respectivos controles: o controle de esterilidade do meio, contendo 200 µL do meio RPMI-1640 e o controle de crescimento, contendo 100 µL do meio RPMI e 100 µL do inóculo. Por fim, 100 µL de inóculo foram distribuídos e as placas foram incubadas a 35°C, com agitação a 170 rpm por até 120 horas.

6.4.5. Controle de qualidade

Para o controle de qualidade dos testes com os antifúngicos, além da cepa de *T. rubrum* ATCC MYA-4438, foram utilizadas as cepas de *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258. Para as leveduras, os inóculos foram preparados de acordo com o documento M27-A3, proposto pelo CLSI (2008b). As suspensões foram preparadas em meio RPMI, colocadas em contato com os fármacos nas placas de microdiluição, juntamente com seus respectivos controles e incubadas a 35°C com agitação a 170 rpm, por 48 horas.

6.4.6. Leitura

Após numerosos ensaios de padronização, as leituras foram realizadas visualmente após a adição de 30 µL de solução de resazurina 0,02% a cada um dos poços das placas de microdiluição,

seguido por nova incubação a 35°C por 24 horas. Na presença de atividade metabólica, a resazurina, um reagente da cor azul, não fluorescente, é reduzida a resorufina, um reagente da cor rosa fluorescente (O'brien *et al.*, 2000).

6.5. CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

Devido à ausência de padronização, a determinação da Concentração Fungicida Mínima foi realizada de acordo com o descrito por Cantón e colaboradores (2003) e Ghannoum, Isham & Long (2015), com algumas modificações. Cem microlitros de cada poço das placas de microdiluição foram subcultivados em placas contendo ágar batata dextrose (Difco, BD biosciences). Todas as placas foram incubadas a 35°C por até 120 horas, sem agitação. A concentração fungicida mínima foi definida como a menor concentração do composto, nanopartícula ou fármaco onde não ocorreu o desenvolvimento de microrganismos.

6.6. COMBINAÇÃO *in vitro* ENTRE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO NÍTRICO E JUBLIA® E NO-np E TERBINAFINA CONTRA *T. rubrum*

As interações *in vitro* entre as nanopartículas de óxido nítrico (NO-np) X efinaconazol (Jublia®) e das NO-np X terbinafina foram verificadas contra *T. rubrum* ATCC MYA-4438, através do método do tabuleiro de xadrez. O inóculo e as soluções trabalho foram preparadas de acordo com o documento M-38 A2 (2008a). Todos os testes foram conduzidos em placas de 96 poços e em meio RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio (*Sigma-Aldrich*), tamponado com MOPS (*Sigma-Aldrich*). Para a combinação entre NO-np e efinaconazol, as concentrações finais testadas nas placas variaram de 10 a 0,0006 mg/L para as NO-np e de 0,5 a 0,000001 mg/L para o efinaconazol. Já para a combinação entre NO-np e terbinafina, as concentrações testadas variaram de 10 a 0,16 mg/L para as NO-np e de 0,5 a 0,001 para a terbinafina. O inóculo foi preparado de modo a obter uma

concentração final de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL. Em seguida, as placas foram incubadas com agitação a 170 rpm à temperatura de 35°C por até 120 horas. Foi realizada leitura visual após a adição de 30 µL de resazurina 0,02% e incubação a 35°C com agitação por 24 horas. A interação foi classificada como sinérgica, indiferente (aditiva) ou antagonista, baseada nos valores do índice de concentração inibitória fracionada (ICIF). O ICIF corresponde à soma das concentrações inibitórias fracionadas (CIF) do fármaco e do composto testados. O CIF corresponde ao valor da CIM da combinação, dividido pelo valor de CIM do fármaco ou composto sozinho.

Valores de $ICIF \leq 0,5$ correspondem a uma interação sinérgica. Se os valores de ICIF forem $> 0,5$ e ≤ 4 , a interação é considerada indiferente (aditiva). Valores de $ICIF > 4$ a interação é considerada antagonista (Barchiesi, Falconi Di Francesco e Scalise, 1997; Johnson *et al.*, 2004; Santos & Hamdan, 2006; Chaturvedi *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2014).

6.7. CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM) DA COMBINAÇÃO ENTRE NO-np E EFINACONAZOL

A determinação da CFM para a combinação entre NO-np e efinaconazol foi determinada como descrito no item 6.5. Em resumo, após o preparo das placas e a incubação a 35°C por 120 dias, 100 µL de cada poço das placas de microdiluição foram semeados em placas contendo ágar batata dextrose (Difco, BD biosciences). A concentração fungicida mínima foi definida como a menor concentração da nanopartícula, efinaconazol e da combinação onde não ocorreu o desenvolvimento de microrganismos.

6.8. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Os efeitos das nanopartículas de óxido nítrico, do efinaconazol e das combinações entre ambos frente às hifas e os microconídios de *T. rubrum* ATCC MYA-4438 foram observados por microscopia eletrônica de transmissão e comparados às células não tratadas. Todos os testes foram realizados em microplacas de 96 poços e o inóculo foi preparado de modo a obter uma concentração final correspondente a 2.5×10^3 UFC/mL. As variáveis testadas foram: 1 = *T. rubrum* não tratado; 2 = *T. rubrum* tratado com o CIM da nanopartícula em combinação (0,15 mg/mL); 3 = *T. rubrum* tratado com CIM do efinaconazol em combinação (0,001 mg/L); 4 = *T. rubrum* tratado com a combinação sinérgica entre NO-np (0,15 mg/mL) e efinaconazol (0,001 mg/L); 5 = *T. rubrum* tratado com CIM de NO-np (10 mg/L); 6 = *T. rubrum* tratado com CIM do efinaconazol (0,016 mg/L); 7 = *T. rubrum* tratado com a combinação dos valores dos MIC's sozinhos de NO-np (10 mg/L) e efinaconazol (0,016 mg/L) e 8 = *T. rubrum* tratado com os menores valores de CIM da combinação indiferente entre NO-np (2,5 mg/L) e efinaconazol (0,016 mg/L). Após o preparo, as placas foram incubadas à temperatura de 35°C, com agitação de 170 rpm, por 96 horas. Em seguida, todo o conteúdo de cada placa foi colocado em tubos Falcon de 15 mL. Os tubos foram centrifugados para que o conteúdo celular fosse concentrado. As células foram lavadas de 2 a 3 vezes com solução salina 0,85% estéril. A preparação para a MET foi feita conforme descrito por Ghannoum e colaboradores (2012). Após as lavagens, as células foram fixadas com glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio. Em seguida, as células foram lavadas e expostas ao dicromato de potássio e acetado de uranila, ambos a 1%. Os elementos fúngicos foram então lavados, embebidos em ágar e cortados em pequenos cubos, de aproximadamente 0,5 a 1 mm³, que foram desidratados em concentrações crescentes de etanol. As amostras foram então seccionadas com o auxílio de um ultramicrotomo e observadas em microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1200 EX.

6.9. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO NÍTRICO EM CÉLULAS DE EPITÉLIO ATRAVÉS DO MÉTODO COLORIMÉTRICO DA SULFORODAMINA B

A toxicidade das nanopartículas de óxido nítrico em células HaCat (queratinócitos normais de pele humana) foi verificada através do método colorimétrico da sulforodamina B. A linhagem celular foi mantida em garrafas próprias para cultivo de células, juntamente com o meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino e 2% de uma solução de antibióticos (estreptomicina, penicilina, gentamicina e anfotericina B) e incubadas em estufa em condições padrão (37°C, 5% CO₂) (Escobar, Afonso & Aristizabal, 2009). As culturas celulares que obtiveram 90% de confluência tiveram os seus meios de cultivo retirados e foram lavadas com 4 mL PBS para que fosse eliminado o excesso de meio com o soro fetal bovino. Em seguida, foram tratadas com 2 mL de solução de tripsina durante 5 minutos a 37 °C. As células tripsinizadas foram lavadas e em seguida ressuspensas em seu meio de cultura, para serem contadas na câmara de Newbauer. Suspensões celulares foram preparadas de modo a obter uma concentração final de 1×10^5 células por poço na placa de microdiluição. Cem microlitros das suspensões celulares foram semeados em placas de 96 poços incubados a 37 °C com tensão de 5% de CO₂. Após 24 horas de incubação, 100 µL das várias concentrações das diluições seriadas das NO-np (nas concentrações de 20 a 0,04 mg/mL) foram colocados em contato com as células. As placas foram então incubadas por mais 24 horas nas mesmas condições. A terbinafina foi utilizada como controle, no intervalo de concentração de 0,5 a 0,001 mg/L. O crescimento celular foi avaliado através do método colorimétrico de sulforodamina B, previamente descrito no item 3.7.3. Em resumo, as células foram fixadas com 50 µL de ácido tricloroacético a 50%, lavadas de 3 a 4 vezes com água destilada e secas à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 50 µL de solução de sulforodamina B a 0,4% em cada poço e as placas foram incubadas a 4°C por 20 min. Os poços foram cuidadosamente lavados com solução de ácido acético a 1%, até que o excesso de corante fosse removido. Para avaliação do crescimento celular, foram adicionados 100 µL de Tris base 10 mM em cada poço, as

placas foram levemente agitadas e as leituras realizadas em leitor de ELISA (BioRad modelo 3550) em densidade óptica (DO) de 570 nm. A porcentagem de células viáveis foi calculada.

6.10. ENSAIO DE FORMAÇÃO DO BIOFILME *in vitro*

O ensaio foi realizado conforme descrito no item 3.8. Em resumo, os dermatófitos foram cultivados em ágar batata dextrose (Difco, BD biosciences) e incubados a 28°C por 7 dias. Os inóculos foram preparados cobrindo as culturas com 5 mL de solução salina estéril a 0,85% e ajustados com a contagem dos conídios no hematócrito, de modo a atingir uma concentração final de 1×10^6 UFC/mL. Em seguida, 200 e 1000 μ L do inóculo foram adicionados a placas de 96 e 24 poços, respectivamente. As placas foram incubadas a 37°C por 3 horas, sem agitação, para que fosse realizada a pré-adesão do biofilme. Após esse período, o sobrenadante foi gentilmente removido dos poços e os mesmos foram lavados por cerca de 2 a 3 vezes com solução salina estéril para a remoção das células não aderentes. Por fim, 200 e 1000 μ L de meio RPMI 1640 foram adicionados aos poços das placas de 96 e 24 poços, que foram novamente incubadas a 37°C por até 96 horas.

6.10.1. Análise morfológica do biofilme

O desenvolvimento dos biofilmes foi observado através de microscopia óptica, em um microscópio invertido Axiovert 200 M (*Carl Zeiss MicroImaging*) nos tempos de 3, 24, 48 e 72 horas.

6.10.2. Determinação da atividade metabólica dos biofilmes pelo ensaio de redução de XTT

As atividades metabólicas dos biofilmes em diferentes intervalos de tempo (3, 12, 24, 48, 72 e 96 horas) foram verificadas através do ensaio de redução de XTT (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5-[carbonilo (fenilamino)]-2H-tetrazólio-hidróxido). Para o teste, foram preparadas

soluções-estoque de XTT (1 mg de sal/mL de PBS) e menadiona (1mM em etanol). Em seguida, 50 µL de solução de XTT + 4 uL de solução de menadiona foram adicionados aos poços das placas 96 poços e incubadas a 37°C por 3 horas. A mudança colorimétrica foi medida utilizando um leitor de ELISA, na densidade óptica de 490nm. Em todos os experimentos, o meio RPMI 1640 isento da formação de biofilme foi incluído como controle negativo (Martinez & Casadevall, 2006; Mowat *et al.*, 2007; Pitangui *et al.*, 2012).

6.10.3. Quantificação da massa do biofilme por coloração com cristal violeta

Para a quantificação da biomassa, os biofilmes foram formados em placas de 96 poços, em meio RPMI 1640, até a maturação. Em seguida, o meio de cultura foi retirado de cada poço e as células aderidas lavadas três vezes com solução salina estéril. Após a secagem em temperatura ambiente, foram adicionados a cada poço, 100 µL de solução de cristal violeta a 0,5% por 5 minutos. Em seguida, os poços foram novamente lavados com água até que o excesso de coloração fosse removido e os biofilmes foram descorados pela adição de 100 µL de etanol a 95% em cada poço. O etanol foi então gentilmente homogeneizado com a pipeta até que o restante do cristal violeta fosse completamente solubilizado (aproximadamente 1 minuto). Por fim, as soluções de cada poço foram transferidas para uma nova placa de 96 poços, que foi lida em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 570 nm (Martinez & Casadevall, 2006; Mowat *et al.*, 2007; Costa-Orlandi *et al.*, 2014).

6.10.4. Efeito da terbinafina, fluconazol, efinaconazol e das nanopartículas de óxido nítrico nas células planctônicas de *T. rubrum*

Para a avaliação dos efeitos dos fármacos e das nanopartículas nas células planctônicas de *T. rubrum*, os inóculos foram preparados na mesma concentração dos biofilmes, em meio RPMI 1640, de modo a atingir uma concentração final na placa de 96 poços correspondente a 1×10^6 UFC/mL e

colocados em contato com as soluções-trabalho dos fármacos e das nanopartículas nas seguintes concentrações: nanopartículas de óxido nítrico: 20 – 0,03 mg/L; fluconazol: 512-0,0625 mg/L; terbinafina: 32-0,001 mg/L; efinaconazol: 320 – 0,6 mg/L . Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 72 horas. Após esse período, a atividade metabólica foi quantificada através do ensaio de redução do XTT. As análises dos resultados foram feitas conforme descrito por Martinez & Casadevall (2006), para as células de *Cryptococcus neoformans*.

6.10.5. Efeito dos antifúngicos e das nanopartículas de óxido nítrico frente aos biofilmes pré-formados

O teste de sensibilidade dos biofilmes foi realizado baseado no que foi descrito por Pierce e colaboradores (2008), com algumas modificações. Os biofilmes foram formados em placas de 96 poços, como descrito no item 6.9. Após a maturação, o meio de cultura foi cuidadosamente aspirado e o biofilme lavado por 3 vezes com 200 µL de solução salina estéril a 0,85% para a remoção das células planctônicas remanescentes nos poços. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas das nanopartículas e dos fármacos (fluconazol, terbinafina e efinaconazol) em meio RPMI-1640, nas mesmas concentrações descritas no item 6.9.4. Cem microlitros de cada diluição foram distribuídos nas placas de 96 poços, juntamente aos seus respectivos controles e as placas foram incubadas a 37°C por 72 horas. Para a verificação da atividade metabólica, foram preparadas soluções-estoque de XTT e menadiona como descrito no item 6.9.2. Cem microlitros dessa solução foram adicionados aos poços após o meio de cultura ser retirado e o biofilme lavado com solução salina estéril a 0,85%. As placas foram então incubadas a 37°C por 3 horas, protegidas da luz. Com a ajuda de uma pipeta multicanal, cerca de 80 µL foram removidos e transferidos para uma nova placa, que foi lida em leitor de ELISA, na absorvância de 490 nm. A redução do crescimento foi então comparada ao controle de crescimento do biofilme, que corresponde a 100% de crescimento, livre de tratamento.

6.10.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para melhor visualização dos danos causados pelas nanopartículas e os fármacos aos biofilmes, foi realizada a microscopia eletrônica de varredura. Os biofilmes foram formados em placas de 24 poços. Após a maturação, foram colocados em contato com as soluções trabalho dos fármacos (Fluconazol 512 mg/L; Terbinafina 32 mg/L; Efinaconazol 320 mg/L) e das nanopartículas de óxido nítrico (40 mg/mL) e incubados a 37°C por 72 horas. Após a incubação, os poços foram lavados com solução salina estéril a 0,85% e os biofilmes foram fixados com 800 µL de solução de glutaraldeído a 2,5% por 1 h em temperatura ambiente. As amostras foram novamente lavadas e desidratadas com concentrações crescentes de álcool etílico, de 50% a etanol absoluto em temperatura ambiente. Os fundos das placas foram cortados com a ajuda de um bisturi e, em seguida, foram secos em dessecador. Os fundos das placas foram fixados em fita de carbono, montadas em cilindros de alumínio com prata (stubs) e colocados em um evaporador de alto vácuo para o revestimento de ouro e então, as características topográficas dos biofilmes foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-6610LV (Martinez *et al.*, 2010).

6.10.7. Microscopia confocal de varredura a laser

A microscopia confocal foi realizada em parceria com o Dr. Luis R Martinez, do Departamento de Ciências Biomédicas da *New York Institute of Technology, Old Westbury*, New York. Os biofilmes foram formados em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares previamente esterilizadas. Após a maturação (72 h), o meio foi cuidadosamente aspirado e as soluções-trabalho do efinaconazol (320 mg/L) e das nanopartículas de óxido nítrico (40 mg/mL) foram adicionadas aos poços. As placas foram incubadas por mais 72 h a 37°C. Foi preparada uma solução de CAAF (Concanavalina A – conjugada ao Alexa fluor 488 – *Molecular Probes*) e FUN 1 (*Molecular Probes*, USA). Essa mistura foi adicionada aos poços contendo os biofilmes formados nas lamínulas e as placas foram incubadas a 37°C, por 45 minutos, protegidas da luz. Em seguida, as lamínulas foram lavadas com água destilada,

retiradas dos poços e vertidas sob 4 μ L de *Fluoromount-G* (*Sigma-Aldrich*), anteriormente depositado sobre lâminas de microscopia para observação em microscópio confocal invertido *Leica TCS SP5* (*Leica Microsystems, Wetzlar, Germany*) (Martinez & Casadevall, 2006).

6.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando o teste t ou análise de variância com pós-teste de Bonferroni, através do software GraphPad Prism 5.0. Os valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

Resultados e Discussão
(Parte II)

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE *T. rubrum* AOS ANTIFÚNGICOS E ÀS NANOPARTÍCULAS PELA TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

A atividade antifúngica da nanopartícula controle (plataforma sem o óxido nítrico); da nanopartícula de óxido nítrico e dos fármacos terbinafina, fluconazol e efinaconazol, foi determinada contra uma cepa ATCC e um isolado clínico de *T. rubrum*. Para o controle de qualidade do teste, foram utilizadas as cepas de *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6259 e a própria *T. rubrum* ATCC MYA-4438. As nanopartículas de óxido nítrico inibiram o crescimento de *T. rubrum*, com valores de CIM iguais a 5 e 10 mg/mL. Já as nanopartículas sem o óxido nítrico não apresentaram atividade nas concentrações testadas, confirmando a propriedade antimicrobiana do óxido nítrico. Além disso, as NO-np tiveram um comportamento fungistático tanto na cepa ATCC, quanto no isolado clínico (**Tabela 6**).

Em relação aos fármacos, o efinaconazol foi o fármaco que melhor inibiu o crescimento de *T. rubrum*, com os menores valores de concentração inibitória mínima (CIM = 0,016 mg/L para *T. rubrum* ATCC MYA – 4438 e CIM = 0,032 – 0,016 mg/L para o isolado clínico), seguido pela terbinafina (CIM = 0,03 mg/L para *T. rubrum* ATCC e CIM = 0,25 – 0,125 mg/L para o isolado clínico) e o fluconazol (CIM = 4 mg/L para *T. rubrum* ATCC e CIM = 32-16 mg/L para o isolado clínico). A concentração fungicida mínima também foi verificada para o efinaconazol, que apresentou um comportamento fungistático para ambas as cepas testadas. Com relação aos controles de qualidade do teste, os valores de CIM ficaram dentro do esperado nos três fungos testados e os resultados corroboraram com o descrito nos documentos M38-A2 (2008a) e M27-A3 (2008b). A razão pela qual os valores de MIC para a terbinafina, fluconazol e efinaconazol encontram-se em intervalos, deve-se

ao fato desse teste ter sido realizado em duplicata, com dois experimentos independentes. Os valores de CIM nas duplicatas foram exatamente iguais em cada experimento independente.

Para o teste de sensibilidade com as nanopartículas, apenas a leitura visual após a adição de resazurina foi utilizada devido ao fato das nanopartículas sedimentarem após algumas horas de incubação mesmo sob agitação, inviabilizando assim, as leituras visual, espectrofotométrica e fluorimétrica. A resazurina é o principal componente do Alamar Blue® e o teste de redução desse reagente iniciou-se no ano de 1950 para avaliar a contaminação por bactérias e leveduras em fluidos biológicos e no leite. Uma vantagem da utilização desse reagente se deve ao fato de não ser tóxico para as células, o que significa que a reação que ocorre não as mata; fato esse que permitiu com que os experimentos de concentração fungicida mínima fossem realizados (O'brien *et al.*, 2000). A concentração inibitória mínima foi considerada a menor concentração do fármaco ou nanopartícula que permaneceu azul ou roxa, indicando que havia inibição do fungo.

Tabela 6. Valores de CIM e CFM para as nanopartículas e fármacos contra espécies de *T. rubrum*.

	NP Controle		NO-np		Terbinafina		Fluconazol		Eflinaconazol	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
Tr ATCC MYA-4438	>20 mg/mL	>20 mg/mL	10 mg/mL	>20 mg/mL	0,03 mg/L	-	4 mg/L	-	0,016 mg/L	>0,5 mg/L
Tr Clínico US	>20 mg/mL	>20 mg/mL	5 mg/mL	>20 mg/mL	0,25- 0,125 mg/L	-	16-32 mg/L	-	0,032 – 0,016 mg/L	>0,5 mg/L
Cp ATCC 22019	-	-	-	-	-	-	4 mg/L	-	-	-
Ck ATCC 6259	-	-	-	-	-	-	64 mg/L	-	-	-

CIM = concentração inibitória mínima; CFM = concentração fungicida mínima; NO-np = nanopartículas de óxido nítrico; Tr = *T. rubrum*; Cp = *C. parapsilosis*; Ck = *C. krusei*.

A resazurina tem sido amplamente utilizada na literatura em testes de sensibilidade para diferentes microrganismos como *H. capsulatum* (Goughenour, Balada-Llasat & Rappleye, 2015), *Mycobacterium tuberculosis* (Palomino *et al.*, 2002; Araujo *et al.*, 2014; Katawera, Siedner & Boum, 2014), *A. fumigatus* (Monteiro *et al.*, 2012) *Candida* spp (Kauffman & Zarins, 1999), *Paracoccidioides* sp. (De Paula E Silva *et al.*, 2013), *E. floccosum*, *M. gypseum*, *M. canis*, *T. tonsurans*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* (Pujol *et al.*, 2002), entre outros. Em relação aos fungos, a maioria dos testes utilizando a resazurina ou o Alamar Blue é realizado em leveduras. Alguns autores relatam resultados controversos nos testes de sensibilidade de fungos filamentosos utilizando o Alamar Blue® (Jahn, Stuben & Bhakdi, 1996), porém, nesse trabalho não houve resultados duvidosos. Sendo assim, acredita-se que esse método possa ser um aliado para os testes de sensibilidade com os dermatófitos.

A plataforma de nanopartículas de óxido nítrico utilizada nesse trabalho, desenvolvida por Friedman e colaboradores (2008), tem sido amplamente estudada no tratamento de feridas e infecções de pele (Kutner & Friedman, 2013). Com relação à sua atividade antifúngica, Macherla e colaboradores (2012) testaram as NO-np contra *C. albicans* *in vitro* e *in vivo*. Os resultados dos testes *in vitro* mostraram que as suspensões de *C. albicans* tratadas com 5 mg/mL de NO-np, em tempo real, reduziram significativamente o crescimento fúngico quando comparado ao controle não tratado. A plataforma de nanopartícula sem o óxido nítrico também foi testada e apresentou atividade contra *C. albicans* ao ser comparado ao controle sem tratamento, contradizendo os resultados do presente trabalho, no qual apenas as NO-np foram capazes de inibir o crescimento de *T. rubrum*, nas concentrações entre 5 e 10 mg/mL. Apesar de relatado na literatura que essas nanopartículas possuem atividade contra *T. mentagrophytes*, não há dados publicados. Estudos de liberação indicaram que 5 mg/mL de NO-np em solução, liberam aproximadamente 75 nM de NO no pico inicial e 50 nM no estado de equilíbrio (*steady state*) enquanto 10 mg/mL liberam o dobro (150 nM no pico inicial e 100 nM no estado de equilíbrio) (Friedman *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2009)

Por ter apresentado um comportamento fungistático contra *T. rubrum*, é preciso aprofundar os estudos sobre o mecanismo de ação do óxido nítrico nesses fungos. A molécula de NO, por ser lipofílica e não carregada, pode facilmente atravessar a bicamada lipídica da membrana celular fúngica e alcançar enzimas metabólicas chave, RNA mensageiro, proteínas e DNA, desativando processos vitais. Além disso, a formação de peroxinitrito a partir da interação com superóxidos pode causar o rompimento da membrana através da peroxidação lipídica, acelerando a degradação celular. O óxido nítrico também é capaz de bloquear a respiração, causando danos oxidativos no DNA. (Jones *et al.*, 2010; Macherla *et al.*, 2012).

Outra plataforma de liberação controlada de NO, composta por uma mistura de N-metilaminopropiltrimetoxisilano (MAP3), N-(6-aminohexil)aminopropiltrimetoxisilano (AHAP3), tetraetilortosilicato (TEOS), metanol, água e amônia, tem sido descrita na literatura como bactericida, especialmente contra *Pseudomonas aeruginosa*. Os autores acreditam que a liberação controlada faça com que o óxido nítrico incorporado atinja o seu alvo de ação mais eficientemente, evitando com que ele necessite se difundir na solução e atravesse longas distâncias para atingir a célula (Hetrick *et al.*, 2008).

O efinaconazol (Jublia[®]) foi recentemente aprovado pelo FDA, nos Estados Unidos e é o primeiro triazólico aprovado para uso tópico (Lipner & Scher, 2015). Estudos *in vitro* mostraram que o efinaconazol teve atividade potente contra *C. albicans*, *C. neoformans*, *Aspergillus fumigatus* e *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. violaceum*, *T. ajelloi*, *M. canis*, *M. gypseum*, *E. floccosum* e *M. furfur* (Tatsumi *et al.*, 2001; Lipner & Scher, 2015). Além de atividade potente, foi verificado nos testes *in vitro*, que para a maioria desses fungos, o novo fármaco foi mais potente que os fármacos comerciais (Jo Siu *et al.*, 2013). Esse dado corrobora com os resultados do presente trabalho, que indicaram que o efinaconazol foi mais potente que o fluconazol e a terbinafina contra *T. rubrum*. Iwata e colaboradores (2014) verificaram o potencial de indução de resistência do efinaconazol às células dos dermatófitos através da exposição contínua *in vitro* de *T. rubrum* ao fármaco (12 semanas) e em

modelos de onicomicoses em porcos da Índia (8 semanas). Não houve evidência de resistência ao fármaco pelas cepas testadas em ambas as condições experimentais, sugerindo que o efinaconazol tem baixo potencial de indução de resistência em dermatófitos.

7.2. COMBINAÇÃO *in vitro* ENTRE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO NÍTRICO E JUBLIA®

A interação entre as NO-np e o efinaconazol foi verificada através do método do tabuleiro de xadrez contra a cepa de *T. rubrum* ATCC MYA-4438. Como controle também foi verificada a interação do veículo da solução tópica sem o fármaco e as NO-np. Os resultados da combinação entre NO-np e efinaconazol estão dispostos na **Tabela 7**. Os valores dos MIC's das NO-np sozinhas e em combinação foram convertidos para mg/L. É possível observar que o valor de CIM para NO-np em combinação foi reduzido em 66 vezes, enquanto que o valor de CIM do efinaconazol reduziu 16 vezes. Nota-se também que o valor do índice de concentração inibitória fracionada é igual a 0,0775, indicando que, nessas concentrações, No-np e Jublia® apresentam uma interação sinérgica forte. O veículo não teve atividade contra *T. rubrum* e não teve intervenção na interação.

Tabela 7. Combinação entre nanopartículas de óxido nítrico X efinaconazol (Jublia®)

Microrganismo	CIM (mg/L)			CIF NO-np	CIF Jublia®	ICIF
	NO-np	E	NO-np / E			
Tr ATCC MYA-4438	10.000	0.016	150 / 0.001	0.015	0.0625	0.0775

CIM = Concentração inibitória mínima; *CIF* = concentração inibitória fracionada; *ICIF* = índice de concentração inibitória fracionada; *NO-np* = nanopartícula de óxido nítrico; *E* = efinaconazol (Jublia®); *NO-np / E* = nanopartículas de óxido nítrico em combinação com o efinaconazol.

Não há relatos na literatura sobre testes *in vitro* de combinação do efinaconazol com outros fármacos, no entanto, Jarratt e colaboradores (2013) verificaram o potencial de interação entre dois ou mais fármacos em pacientes voluntários com e sem onicomicoses, utilizando o tratamento tópico com efinaconazol a 10%. Os resultados mostraram que o uso da solução tópica resultou em exposição sistêmica muito baixa do efinaconazol quando aplicado em condições máximas, sugerindo que Jublia® tem um potencial remoto para interações com outros fármacos.

7.3. COMBINAÇÃO *in vitro* ENTRE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO NÍTRICO E TERBINAFINA

Os resultados da interação entre NO-np e terbinafina mostram que os valores de CIM de ambos reduziram quando em combinação. A concentração inibitória mínima de NO-np foi reduzida 66 vezes quando em combinação com a terbinafina, enquanto que a CIM desta foi reduzida duas vezes quando em combinação com as NO-np. O valor do ICIF da combinação corresponde a 0,515 (**Tabela 8**), o que pode ser considerado como um efeito sinérgico se houver arredondamento. Para esse teste foram feitos cinco experimentos independentes e apenas dois apresentaram resultados semelhantes. Mais experimentos devem ser realizados com outras cepas de *T. rubrum* para a confirmação do sinergismo.

Tabela 8. Combinação entre nanopartículas de óxido nítrico X terbinafina

Microrganismo	CIM (mg/L)			CIF NO- np	CIF Terbinafina	ICIF
	NO- np	T	NO-np / Tr			
Tr ATCC MYA-4438	10.000	0.016	150 / 0.008	0.015	0.5	0.515

CIM = Concentração inibitória mínima; CIF = concentração inibitória fracionada; ICIF = índice de concentração inibitória fracionada; NO-np = nanopartícula de óxido nítrico; T = terbinafina; NO-np / T = nanopartículas de óxido nítrico em combinação com a terbinafina; Tr = T. rubrum.

7.4. CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM) DA COMBINAÇÃO ENTRE NO-np E EFINACONAZOL

A concentração fungicida mínima da combinação entre as NO-np e Jublia® foi determinada através do plaqueamento de 100 µL de cada poço das placas de 96 poços em placas de Petri contendo ágar batata dextrose (Difco). Os resultados mostram que a combinação teve um efeito fungistático na cepa de *T. rubrum* testada (**Tabela 9**).

Como observado no item 7.2, a combinação entre NO-np X efinaconazol parece ser mais benéfica para a nanopartícula do que para o próprio fármaco. Como o alvo de ação do efinaconazol é a enzima 14 α -demetilase, essencial na biossíntese do ergosterol da membrana da célula fúngica, podemos sugerir que, durante a combinação, o efinaconazol promova o desarranjo da membrana, facilitando a penetração das nanopartículas de óxido nítrico e tornando-as aptas a agir na célula de forma a desacelerar ou até mesmo parar o seu metabolismo, de um modo não letal.

Tabela 9. Valores de MIC e MFC da combinação entre NO-np X Jublia® (Efinaconazol)

	NO-np (sozinha)		Jublia® (sozinha)		No-np + Jublia® (combinação)	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>T. rubrum</i> ATCC MYA - 4438	10 mg/mL	> 20 mg/mL	0.016 mg/L	> 0.5 mg/L	NO-np 0.15 mg/mL + Jublia® 0.001 mg/L	>NO-np 10 mg/mL + Jublia 0.5mg/L

NO-np = nanopartículas de óxido nítrico; *CIM* = concentração inibitória mínima; *CFM* = concentração fungicida mínima.

7.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

A MET foi realizada a fim de observar melhor os efeitos das NO-np, Jublia® (Efinaconazol) e da combinação entre ambos nas células de *T. rubrum*. ATCC MYA-4438 (**Fig. 54**). As **Figs 54 A, B e C** representam as hifas e alguns microconídios não tratados em cortes transversais, longitudinais, com organelas, paredes celulares e citoplasmas intactos. As **Fig. 54 D, E e F** mostram as hifas de *T. rubrum* tratadas com as NO-np, na concentração de 10 mg/mL (C). Com o tratamento, as paredes celulares parecem não ter sofrido alterações, assim como as organelas. Nota-se também, o acúmulo de algo sugestivo a vesículas intracelulares ou até mesmo das próprias nanopartículas dentro dos vacúolos (representados pelos grânulos pretos), que podem ter sido fagocitadas pelo fungo.

As **Figs 54 G, H e I** mostram a MET das células tratadas com a concentração do MIC de Jublia® (0,016 mg/L). As paredes celulares parecem não ter sofrido alterações; os vacúolos,

diferentemente dos vacúolos representados nas **Figs 54 D, E e F**, não possuem grânulos pretos, porém é possível observar grandes manchas brancas em quase toda a extensão das células, que podem ser sugestivas vacúolos aumentados.

As células tratadas com a combinação entre as duas concentrações do MIC estão representadas nas **Fig. 54 J, K e L**, nas quais nota-se visivelmente o aumento de espessura da parede celular. É possível também notar a presença de vacúolos aumentados e a penetração do que parece ser os agregados de nanopartículas para dentro das células, a partir da parede celular. Esse aumento da espessura já foi descrito em *A. fumigatus* tratado com lipopeptídeos (Kurtz *et al.*, 1994). Os autores justificam que o aumento da espessura da parede possa ocorrer devido à inibição de um dos fatores limitadores de crescimento da parede celular, induzido pelo peptídeo.

Por fim, as **Fig. 54 M, N e O** mostram as células de *T. rubrum* ATCC MYA-4438 tratadas com a combinação que produziu uma interação sinérgica. É possível observar uma parede celular menos espessa, além de danos no citoplasma e em toda a extensão da hifa.

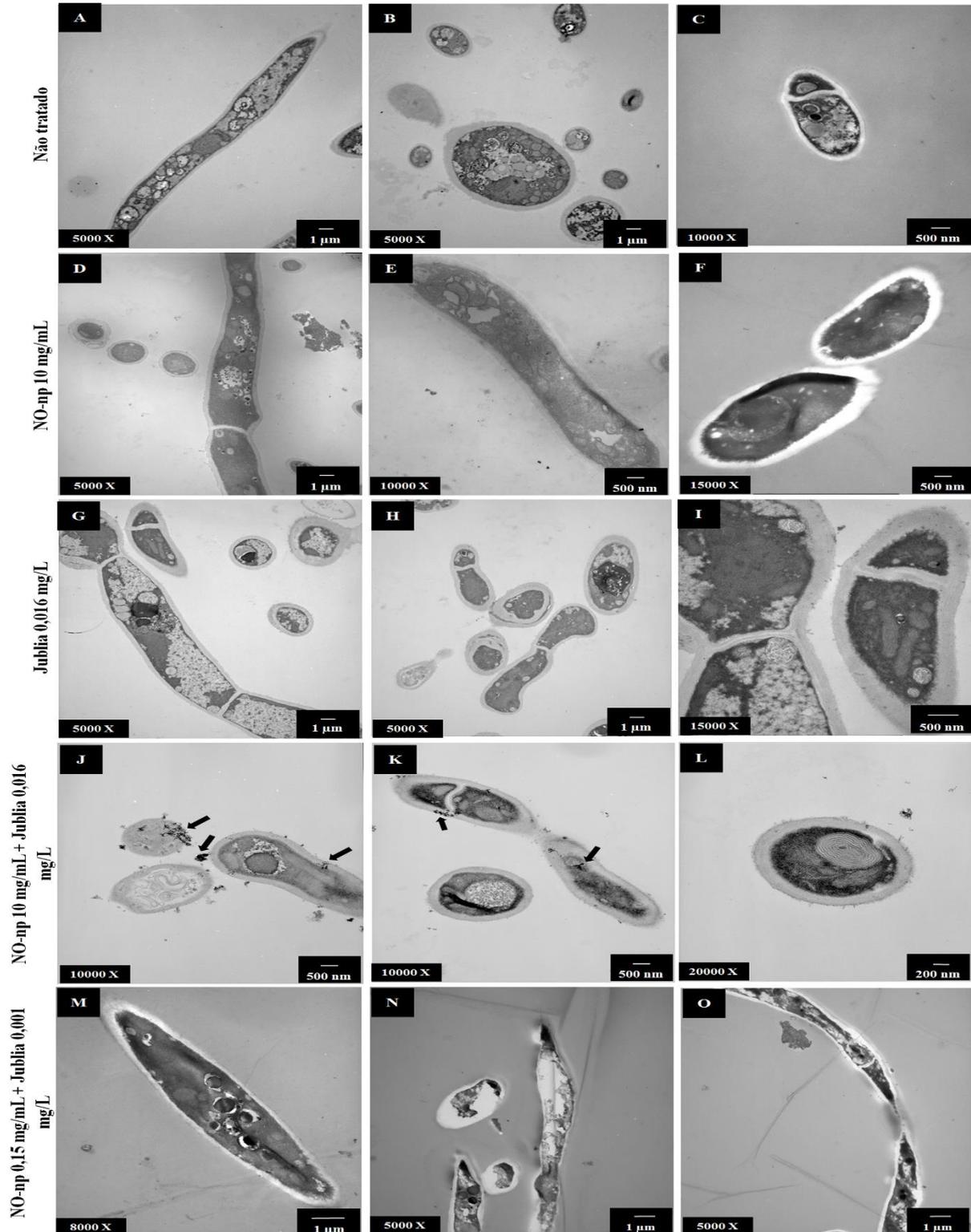
Com relação à membrana celular, não é possível observá-la com nitidez em nenhuma das figuras, nem mesmo no controle não tratado. Sendo assim, não é possível verificar o desarranjo da bicamada lipídica causada pelo efinaconazol. Porém, a teoria sugerida no item anterior de que provavelmente a atuação do efinaconazol na bicamada lipídica da membrana, causando um desarranjo, possa facilitar a entrada dos aglomerados de nanopartículas para dentro da célula, para que o óxido nítrico aja com maior facilidade, foi reforçada nas **Fig. 54 K e 54 J**. Os pequenos aglomerados de grânulos pretos coincidem com o tamanho das NO-np caracterizadas por MET por Friedman e colaboradores (2008), que medem aproximadamente 10 nm por partícula e cerca de 130 nm por agregado.

Na investigação do mecanismo de ação do efinaconazol, Tatsumi e colaboradores (2013) realizaram as microscopias eletrônicas de varredura (MEV) e de transmissão (MET) dos conídios após o tratamento por 24 horas com diferentes concentrações do fármaco. Nas concentrações

compreendidas entre 0,01 a 0,001 mg/L, foram observados encurtamento da distância interseptal, inchaço globular e espessamento da parede celular. Já nas concentrações compreendidas entre 10 e 0,1 mg/L de efinaconazol, foram observadas hifas de larguras não uniformes, separação de membrana plasmática a partir da parede celular, acumulação de grânulos elétricos densos no espaço compreendido entre a parede celular e a membrana plasmática e degeneração de organelas. Essas alterações tornaram-se mais proeminentes com concentrações crescentes do fármaco. Esses dados corroboraram em parte com os resultados obtidos no presente trabalho, no qual não foi possível obter mais detalhes sobre a membrana plasmática. Além disso, não foram observados danos nas organelas.

O vacúolo é de interesse significativo para o campo de tráfego de membrana, uma vez que recebe as membranas das vias biossintéticas, endocítica e autofágica da célula. Estudos recentes mostraram que existem vacúolos com uma grande variedade de morfologias e que as suas funções são altamente adaptadas às exigências do nicho ecológico das espécies. Os vacúolos participam diretamente no transporte de nutrientes a longas distâncias através do micélio; na regulação da extensão e ramificação das hifas; no tempo do ciclo celular, autofagia, além de participarem da indução de processos morfogenéticos vitais, tais como formação de apressórios e pseudohifas (Veses, Richards & Gow, 2008).

Figura 54. Microscopia eletrônica de transmissão das células planctônicas de *T. rubrum* tratadas com No-np, Jublia® (Efinaconazol) e com a combinação entre No-np X Jublia® (Efinaconazol). A-C: cortes longitudinais e transversais de hifas e microconídios de *T. rubrum* sem tratamento. D-F: tratamento com No-np 10 mg/mL; G-I: tratamento com efinaconazol 0,016 mg/L; J-L: tratamento com a combinação entre NO-np 10 mg/mL + efinaconazol 0,016 mg/L; M-O: tratamento com a combinação entre NO-np 0,15 mg/ml + efinaconazol 0,016 mg/L. As setas pretas apontam os aglomerados de NO-np penetrando nas hifas.

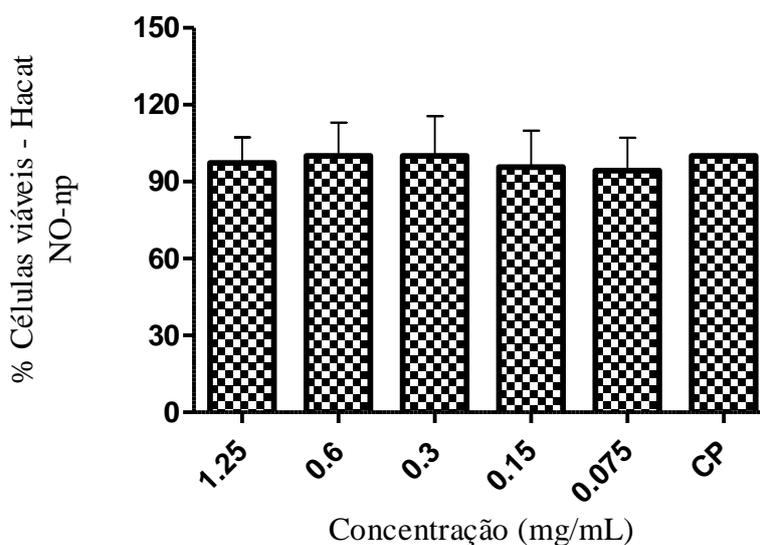


7.6. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO NÍTRICO EM CÉLULAS DE EPITÉLIO ATRAVÉS DO MÉTODO COLORIMÉTRICO DA SULFORODAMINA B

As NO-np foram testadas quanto à sua toxicidade em linhagens celulares HaCat (queratinócitos de pele humana imortalizados). As concentrações testadas foram as correspondentes ao intervalo de 40 – 0,075mg/mL, porém, como as nanopartículas se depositam no fundo das microplacas, só foi possível testar a toxicidade das concentrações compreendidas no intervalo de 1,25 a 0,075 mg/mL.

Em todas as concentrações testadas, a viabilidade celular foi maior que 90%, indicando que as NO-np não são tóxicas para as células epiteliais humanas quando comparadas ao controle sem tratamento ($p > 0,05$) (**Fig. 55**). A toxicidade das NO-np foi previamente testada por Friedman e colaboradores (2008) em fibroblastos de pulmão humano, através da coloração por azul de Tripán. Foi demonstrado que os fibroblastos tratados com NO-np exibiram toxicidade mínima quando comparados aos controles.

Figura 55. Citotoxicidade das NO-np em linhagens celulares HaCat (queratinócitos de pele humana)



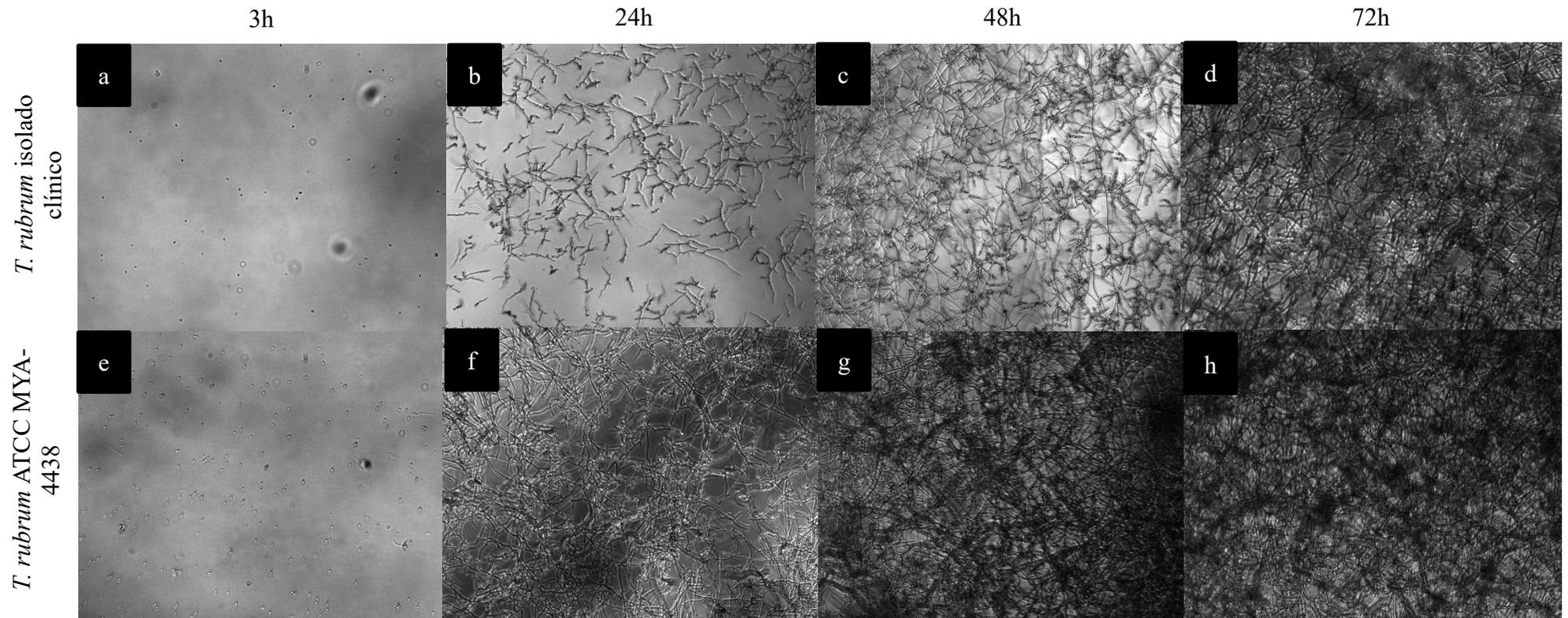
NO-np = nanopartículas de óxido nítrico; CP = controle positivo.

7.7. ENSAIO DE FORMAÇÃO DO BIOFILME *in vitro*

7.7.1. Análise morfológica dos biofilmes

O desenvolvimento dos biofilmes formados pelo isolado clínico e pela cepa de *T. rubrum* ATCC MYA 4438 foi avaliado por meio de microscopia óptica, em intervalos de tempo diferentes. Na **Fig. 56**, as letras **a**, **b**, **c** e **d** mostram o desenvolvimento do biofilme formado pelo isolado clínico de *T. rubrum* após 3, 24, 48 e 72 horas. Já as letras **e-h**, representam o desenvolvimento da cepa ATCC de *T. rubrum* nos mesmos intervalos de tempo. Observou-se uma biomassa mais densa e compacta tanto no isolado clínico, quanto na cepa ATCC, após 72 horas de incubação. Esses resultados corroboram com os resultados anteriores mostrados no item 4.4.1, com as cepas de *T. rubrum* ATCC 28189 e *T. mentagrophytes* ATCC 11481, nas quais também foi possível observar a formação de uma massa densa nos biofilmes após 72 h.

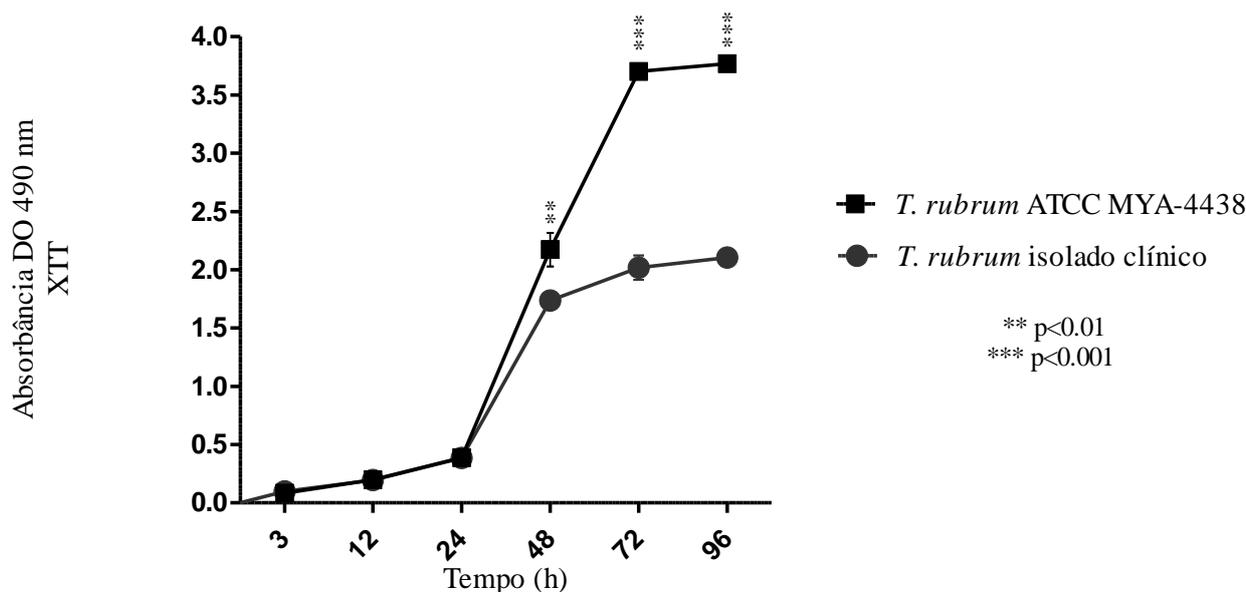
Figura 56. Análise morfológica dos biofilmes de *T. rubrum*, por microscopia óptica, no microscópio invertido Axiovert 200 M (Carl Zeiss MicroImaging). a= Morfologia do biofilme do isolado clínico de *T. rubrum* após 3h; b= Morfologia do biofilme do isolado clínico de *T. rubrum* após 24 h; c= Morfologia do biofilme do isolado clínico de *T. rubrum* após 48h; d= Biofilme do isolado clínico de de *T. rubrum* após 72h; e= Morfologia do biofilme de *T. rubrum* ATCC MYA-4438 após 3h; f= Morfologia do biofilme de *T. rubrum* ATCC MYA-4438 após 24h; g= Morfologia do biofilme de *T. rubrum* ATCC MYA-4438 após 48h; h= Biofilme de *T. rubrum* ATCC MYA-4438 após 72h.



7.7.2. Determinação da atividade metabólica dos biofilmes pelo ensaio de redução de XTT

Os resultados dispostos na **Fig. 57** mostram que as atividades metabólicas iniciais dos biofilmes ocorreram após 3 horas de incubação (período de pré-adesão). Até às 24 horas iniciais, houve um ligeiro aumento nas atividades metabólicas de ambos, com nenhuma significância estatística entre o isolado clínico e a cepa ATCC ($p > 0,05$). Após as 24 horas, as atividades metabólicas tiveram um aumento substancial até o período de 72 horas. Nota-se que, nesse intervalo de tempo, o biofilme formado por *T. rubrum* ATCC MYA-4438 teve maior atividade metabólica quando comparado ao biofilme formado pelo isolado clínico ($p < 0,01$). Após as 72 horas, as atividades metabólicas de ambos os biofilmes tenderam a atingir um *plateau*, portanto, o período de 72 horas foi considerado o tempo ideal de maturação dos biofilmes de *T. rubrum*.

Figura 57. Cinética de formação do biofilme de *T. rubrum* pelo ensaio de redução do XTT.



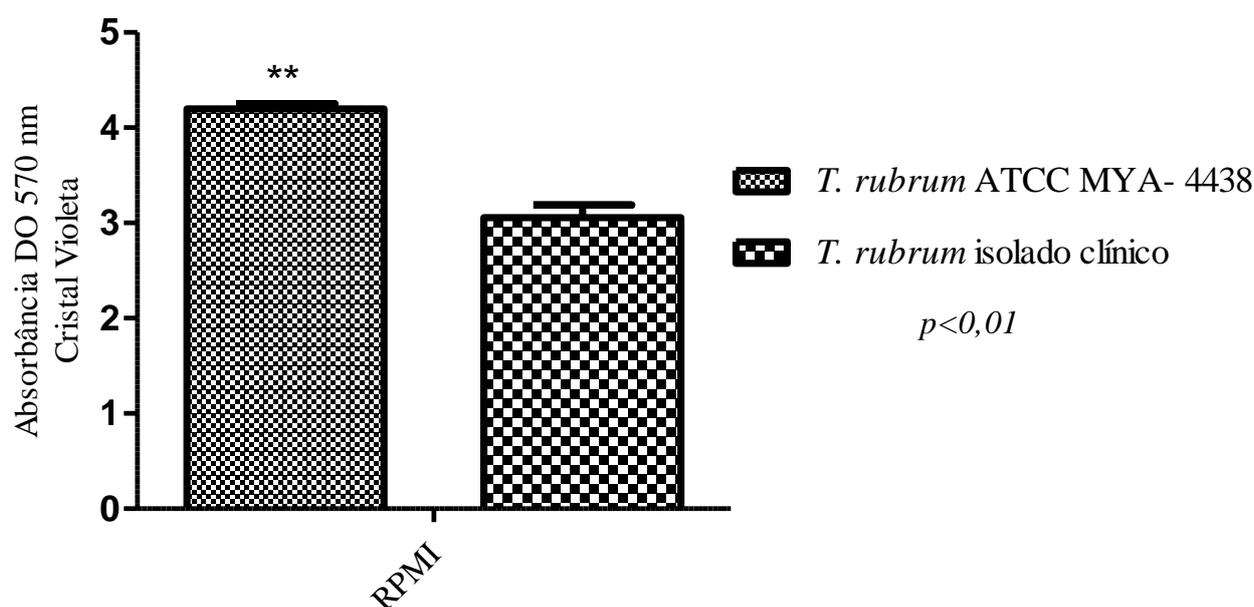
Os resultados obtidos corroboraram com os resultados mostrados anteriormente, no item 4.4.2., nos biofilmes formados por outras cepas ATCC e isolados clínicos de *T. rubrum* e *T.*

mentagrophytes. Para todos os biofilmes, a maturação *in vitro* foi considerada no tempo de 72 horas de incubação. Apesar de ainda ocorrer um ligeiro aumento da atividade metabólica no tempo de 96 horas, os biofilmes começam a crescer em direção às extremidades dos poços e se destacam do fundo das placas, dificultando o trabalho posterior. Esse fato, somado à tendência de atingir o *plateau* não deixam dúvidas de que o tempo ideal para a maturação dos biofilmes formados pelos dermatófitos seja após 72 horas de incubação.

7.7.3. Quantificação da massa do biofilme por coloração com cristal violeta

A quantificação da massa dos biofilmes maduros foi feita por coloração pelo cristal violeta. A **Fig. 58** mostra que os biofilmes formados pela cepa ATCC de *T. rubrum* produziram mais biomassa após 72 horas de incubação que os biofilmes formados pelo isolado clínico de *T. rubrum* ($p=0,0013$).

Figura 58. Quantificação da massa dos biofilmes maduros de *T. rubrum* através da coloração por cristal violeta.



7.7.4. Efeito da terbinafina, fluconazol, efinaconazol e das nanopartículas de óxido nítrico nas células planctônicas de *T. rubrum*

Para a avaliação do efeito dos fármacos e das NO-np nas células planctônicas de *T. rubrum*, os inóculos foram preparados em meio RPMI 1640, na mesma concentração utilizada para a formação dos biofilmes e, em seguida, foram co-incubados com as soluções trabalho de fluconazol (512-1mg/L), terbinafina (32-0,06 mg/L), efinaconazol (320-0,6 mg/L) e NO-np (20-0,04 mg/mL), na temperatura de 37°C, por 72 horas, juntamente com os respectivos controles. Após esse período, as atividades metabólicas das células planctônicas foram quantificadas pelo ensaio de redução do XTT. As placas foram lidas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 492 nm. Em razão de a terbinafina ser um fármaco fungicida, foi considerada atividade, a redução de pelo menos 80% da atividade metabólica quando comparado ao controle sem tratamento (CP). Já para o fluconazol, efinaconazol e para as NO-np, por terem comportamento fungistático, foi considerada atividade a redução de pelo menos 50% da atividade metabólica.

Para o fluconazol (**Fig.59A**), as concentrações que reduziram em 50% a atividade metabólica das células planctônicas de *T. rubrum* ATCC MYA-4438 e do isolado clínico, foram as maiores ou iguais a 16 e 32 mg/L, respectivamente. Já para a terbinafina (**Fig.59B**), as concentrações que reduziram em 80% as atividades metabólicas, foram as iguais ou superiores a 0,5 mg/L para o isolado clínico de *T. rubrum*. Todas as concentrações testadas de terbinafina reduziram em 80% a atividade metabólica da cepa ATCC. Para o efinaconazol (**Fig.59C**), todas as concentrações testadas reduziram em pelo menos 50% as atividades metabólicas de *T. rubrum*, tanto da cepa ATCC, quanto do isolado clínico.

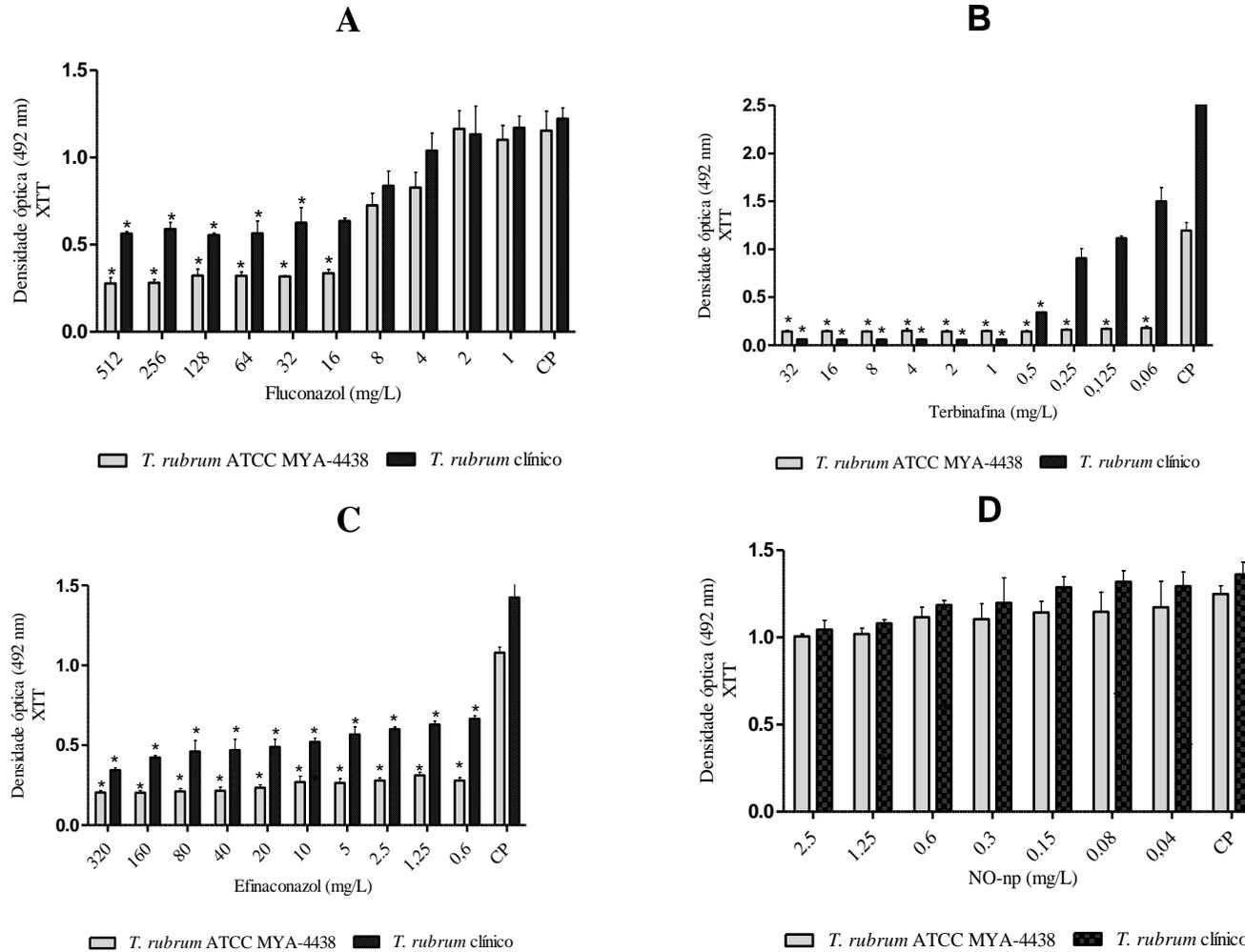
As NO-np foram testadas a partir da concentração de 20 mg/mL, porém, devido à sua sedimentação com o decorrer do tempo, apenas as concentrações compreendidas entre 2,5 - 0,04 mg/mL foram passíveis de leitura no espectrofotômetro. É possível observar uma ligeira redução das

atividades metabólicas nas concentrações de 2,5 e 1,25 mg/mL, porém nenhuma concentração do intervalo testado foi capaz de reduzir em 50% as atividades metabólicas de *T. rubrum* (**Fig 59D**).

Os testes foram feitos em duplicata e em dois experimentos independentes, porém, baseados nos testes anteriores, é necessário realizar pelo menos cinco experimentos independentes. Além disso, testes com concentrações menores de terbinafina e efinaconazol devem ser realizados. Apesar disso, observou-se que as células planctônicas foram sensíveis ao fluconazol, terbinafina e ao efinaconazol, porém foram resistentes às concentrações de NO- η p nas quais a leitura espectrofotométrica foi possível.

Assim, como na parte I, os dados foram analisados através da medida da densidade óptica, conforme descrito por Martinez & Casadevall (2006), para os biofilmes de *C. neoformans*.

Figura 59. Efeito do fluconazol, terbinafina, efinaconazol e nanopartículas de óxido nítrico nas células planctônicas de *T. rubrum*, determinado pelo teste de redução do XTT. Os asteriscos denotam redução significativa da atividade metabólica (* $p < 0,05$), em comparação ao controle sem tratamento (CP).



7.7.5. Efeito dos antifúngicos e das nanopartículas de óxido nítrico frente aos biofilmes pré-formados de *T. rubrum*

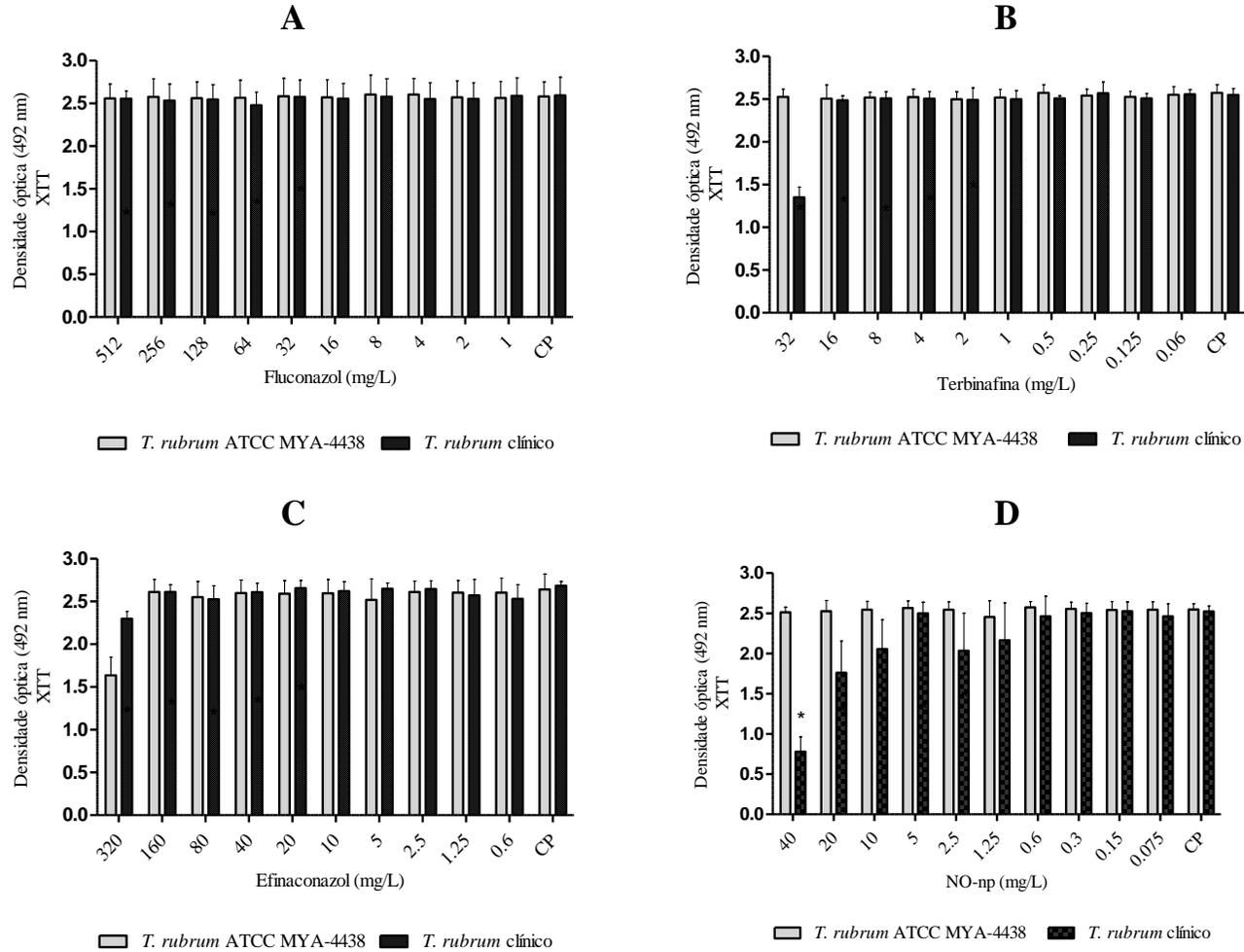
Para a realização desse teste, foi adotado o protocolo descrito por Pierce e colaboradores (2008) para biofilmes fúngicos. Em resumo, os biofilmes foram formados em meio RPMI e, após a maturação, o sobrenadante foi aspirado e as soluções de trabalho de fluconazol, terbinafina, efinaconazol e das NO-np, nas mesmas concentrações descritas no item 7.7.5, foram adicionadas. As placas foram incubadas por mais 72 horas. Em seguida, o sobrenadante foi retirado, os biofilmes foram lavados e a atividade metabólica foi medida através do ensaio de redução do XTT. Para a interpretação dos resultados, foram adotados os mesmos critérios do item anterior: foi considerada atividade a redução de 50% da atividade metabólica para o fluconazol, efinaconazol e NO-np e 80% para a terbinafina.

Os resultados dispostos na **Fig. 60** mostram que os biofilmes maduros incubados com as diversas concentrações de fluconazol (**Fig.60A**), exibiram valores de atividades metabólicas semelhantes às observadas nos controles ($p>0,05$), indicando que os biofilmes de *T. rubrum* foram resistentes a todas as concentrações de fluconazol testadas. O mesmo ocorreu quando os biofilmes foram incubados com a terbinafina (**Fig.60B**) e o efinaconazol (**Fig.60C**). Em todas as concentrações testadas, as atividades metabólicas não foram reduzidas em 80% para a terbinafina e em 50% para o fluconazol. Nota-se, porém uma redução significativa ($p<0,05$) da atividade metabólica do biofilme do isolado clínico, quando tratado com 32 mg/L de terbinafina, no entanto, essa redução não é suficiente para considerar a atividade. O mesmo ocorreu nos biofilmes de *T. rubrum* ATCC e do isolado clínico tratados com 320 mg/L de efinaconazol ($p<0,05$); ocorre uma redução significativa, mas não suficiente para que seja considerada atividade.

Em relação às NO-np, a interpretação dos resultados não foi comprometida no tratamento dos biofilmes com as concentrações maiores da nanopartículas, uma vez que todo o sobrenadante foi

aspirado e os biofilmes foram lavados antes da adição do sal de tetrazólio. A figura **60 D** mostra que, para a cepa ATCC, os biofilmes foram resistentes a todas as concentrações testadas de nanopartículas, porém, para cepa clínica de *T. rubrum*, verificou-se uma redução de mais de 50% da atividade metabólica, em comparação ao controle sem tratamento, quando o biofilme foi tratado com as NO-np na concentração de 40 mg/mL.

Figura 60. Efeito do fluconazol, terbinafina, efinaconazol e nanopartículas de óxido nítrico nos biofilmes pré-formados de *T. rubrum*, determinado pelo teste de redução do XTT. Os asteriscos denotam redução significativa da atividade metabólica (* $p < 0,05$), em comparação ao controle sem tratamento (CP).



7.7.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para melhor visualização da topografia dos biofilmes de *T. rubrum* formados em meio RPMI 1640, assim como dos danos causados pelo tratamento aos biofilmes pré-formados, foi realizada a MEV.

A **Fig. 61** mostra as topografias dos biofilmes maduros da cepa ATCC (**Fig 58 a, b e c**) e do isolado clínico de *T. rubrum*, formados em meio RPMI, sem tratamento. Observa-se uma biomassa compacta e matriz extracelular em quantidade razoável, cobrindo e conectando as hifas.

Já a **Fig. 62** mostra os mesmos biofilmes tratados com fluconazol, na concentração de 512 mg/mL. O fluconazol aparentemente não causou danos à estrutura dos biofilmes. Observa-se uma grande quantidade de matriz extracelular cobrindo as hifas nos biofilmes formados pela cepa ATCC (**a, b, c**). O biofilme formado pelo isolado clínico aparenta-se menos denso e com menor quantidade de matriz exopolimérica, porém não foram observados danos visíveis às hifas (**d, e, f**). Esses resultados acordam com os resultados da **Fig.60A**, que mostra que não há redução nas atividades metabólicas dos biofilmes de *T. rubrum* tratados com as diversas concentrações de fluconazol, o que comprova a resistência dos biofilmes a esse fármaco.

A **Fig. 63** mostra os biofilmes de *T. rubrum* tratados com a terbinafina, na concentração de 32 mg/L. Não houve dano aparente nos biofilmes formados pela cepa ATCC, que permaneceu denso, compacto e com grande quantidade de matriz extracelular (**a, b, c**). O biofilme formado pelo isolado clínico aparenta menos denso, com menor quantidade de material polissacarídico e com poucas hifas danificadas (**d, e, f**). Esses resultados também corroboram com os resultados anteriores, dispostos na **Fig.60B**, que mostram que ambos os biofilmes se apresentaram resistentes à terbinafina. Não houve diminuição na atividade metabólica dos biofilmes da cepa ATCC tratados com esse fármaco, porém, a concentração de 32 mg/L diminuiu significativamente a atividade metabólica do biofilme do isolado clínico, porém não o suficiente para considerar atividade.

Já a **Fig. 64** mostra o efeito do efinaconazol na concentração de 320mg/L nos biofilmes pré-formados de *T. rubrum*. Esse fármaco provocou danos em ambos os biofilmes, porém os danos maiores foram observados no biofilme formado pelo isolado clínico (**d, e, f**). É possível observar hifas com paredes celulares colabadas, com provável extravasamento de material intracelular. Porém ainda é possível observar hifas intactas, em maior quantidade nos biofilmes formados pela cepa ATCC (**a, b, c**). Observou-se também a presença poucas estruturas semelhantes a artroconídios ou artrosporos no biofilme do isolado clínico tratado (**e, f**). Os resultados observados na MEV dos biofilmes tratados foram piores que os observados nos testes com o sal de tetrazólio. De acordo com esse, há redução nas atividades metabólicas de ambos os biofilmes no tratamento com efinaconazol 320mg/L, porém essa redução não é significativa a ponto de ser considerada atividade anti-biofilme. A redução é significativa quando comparada ao controle ($p < 0,05$), porém os danos verificados na MEV são bem maiores.

Por último, a **Fig. 65** mostra os biofilmes pré-formados tratados com 40mg/mL de NO-np. Essa concentração não provocou destruição no biofilme formado pela cepa ATCC (**a, b, c**), no qual ainda pode ser observada grande quantidade de matriz extracelular e hifas intactas intercalando-se com aglomerados de nanopartículas. Já no biofilme formado pela cepa clínica, foram observados danos extensos às hifas e pouca matriz extracelular cobrindo as hifas intactas e as danificadas (**d, e, f**). Esses resultados também corroboram com os resultados dispostos na **Fig.60 D**, que mostram que o biofilme formado pela cepa ATCC foram resistentes as nanopartículas, enquanto que o biofilme pré-formado pelo isolado clínico foram sensíveis às NO-np.

Figura 61. Microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes maduros de *T. rubrum* ATCC MYA-4438 (a, b e c) e do isolado clínico (d, e e f), sem tratamento, formados em meio RPMI 1640. As setas denotam a matriz extracelular.

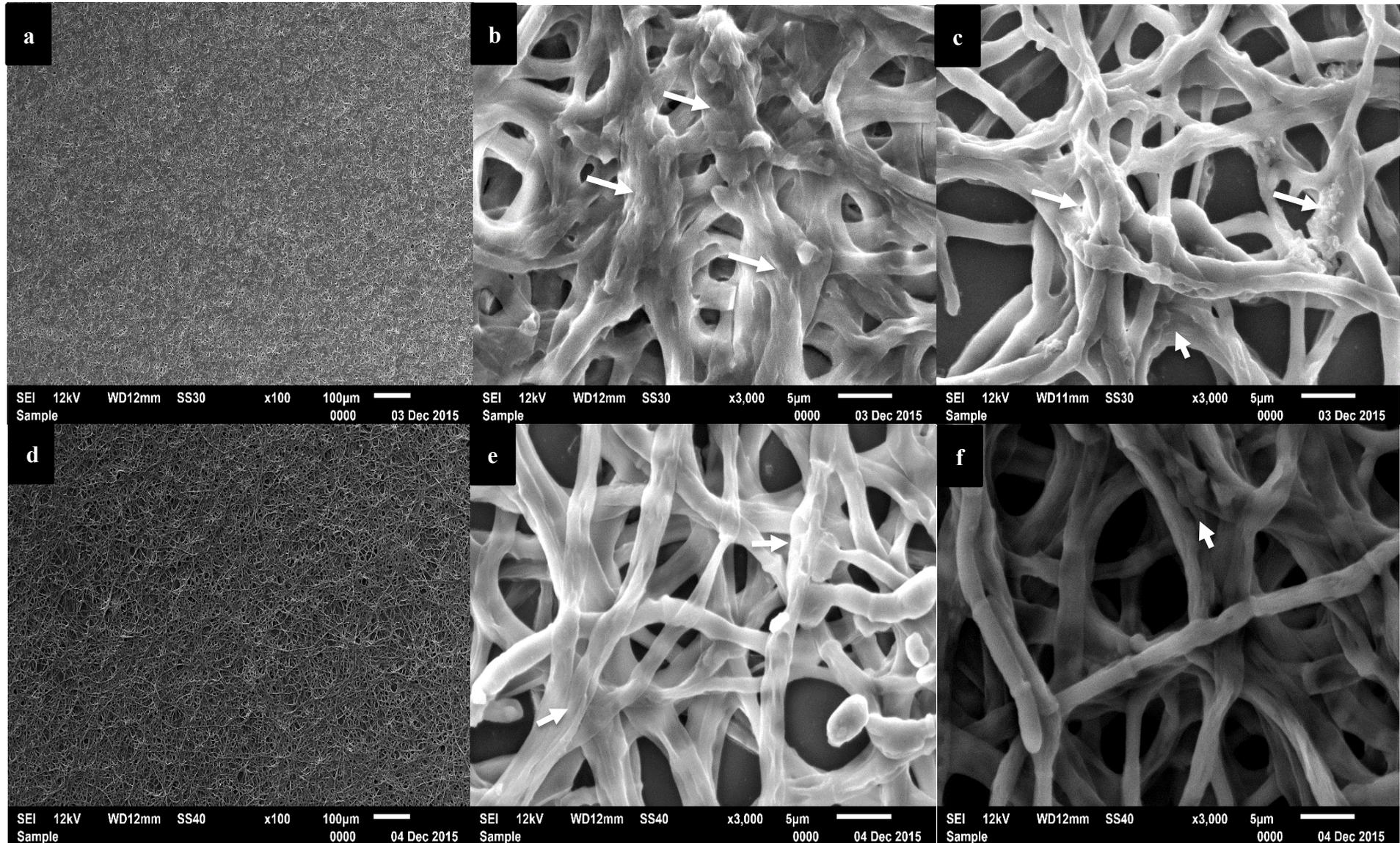


Figura 62. Microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes maduros de *T. rubrum* ATCC MYA-4438 (a, b e c) e do isolado clínico (d, e e f), tratados com fluconazol, na concentração de 512 mg/L. formados em meio RPMI 1640. As setas denotam a matriz extracelular polimérica em maior quantidade nos biofilmes tratados da cepa ATCC. O biofilme tratado da cepa clínica aparenta mais espaçado e com menor quantidade de matriz extracelular. Não foram observados danos às hifas.

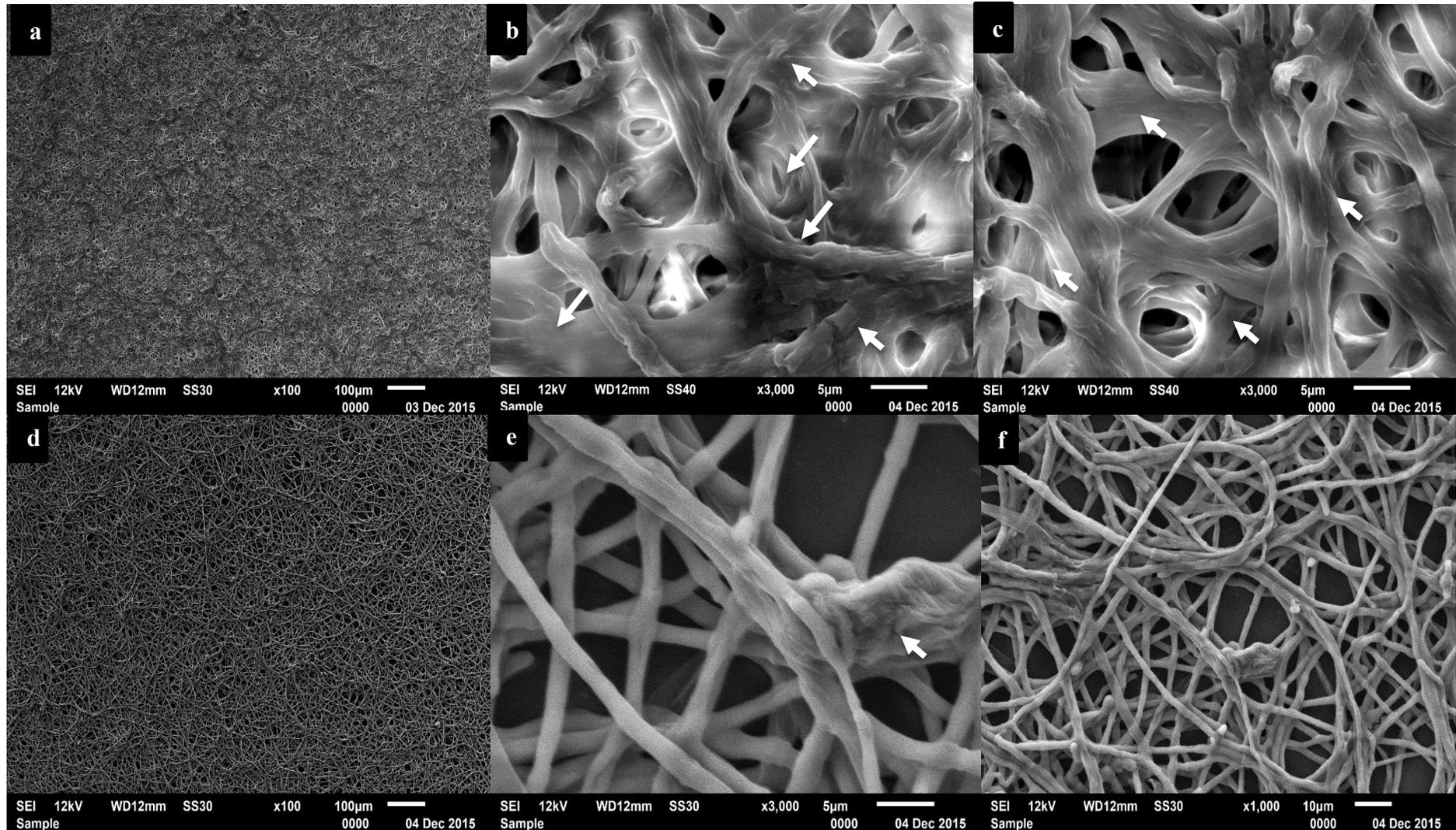


Figura 63. Microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes maduros de *T. rubrum* ATCC MYA-4438 (a, b e c) e do isolado clínico (d, e e f), tratados com terbinafina, na concentração de 32 mg/L. As setas denotam a matriz extracelular polimérica, que aparece em maior quantidade nos biofilmes tratados da cepa ATCC. Assim como na Fig. 58, o biofilme da cepa clínica tratado com a terbinafina aparenta mais espaçado e com pouca quantidade de matriz extracelular. Poucos danos foram observados nas hifas (f).

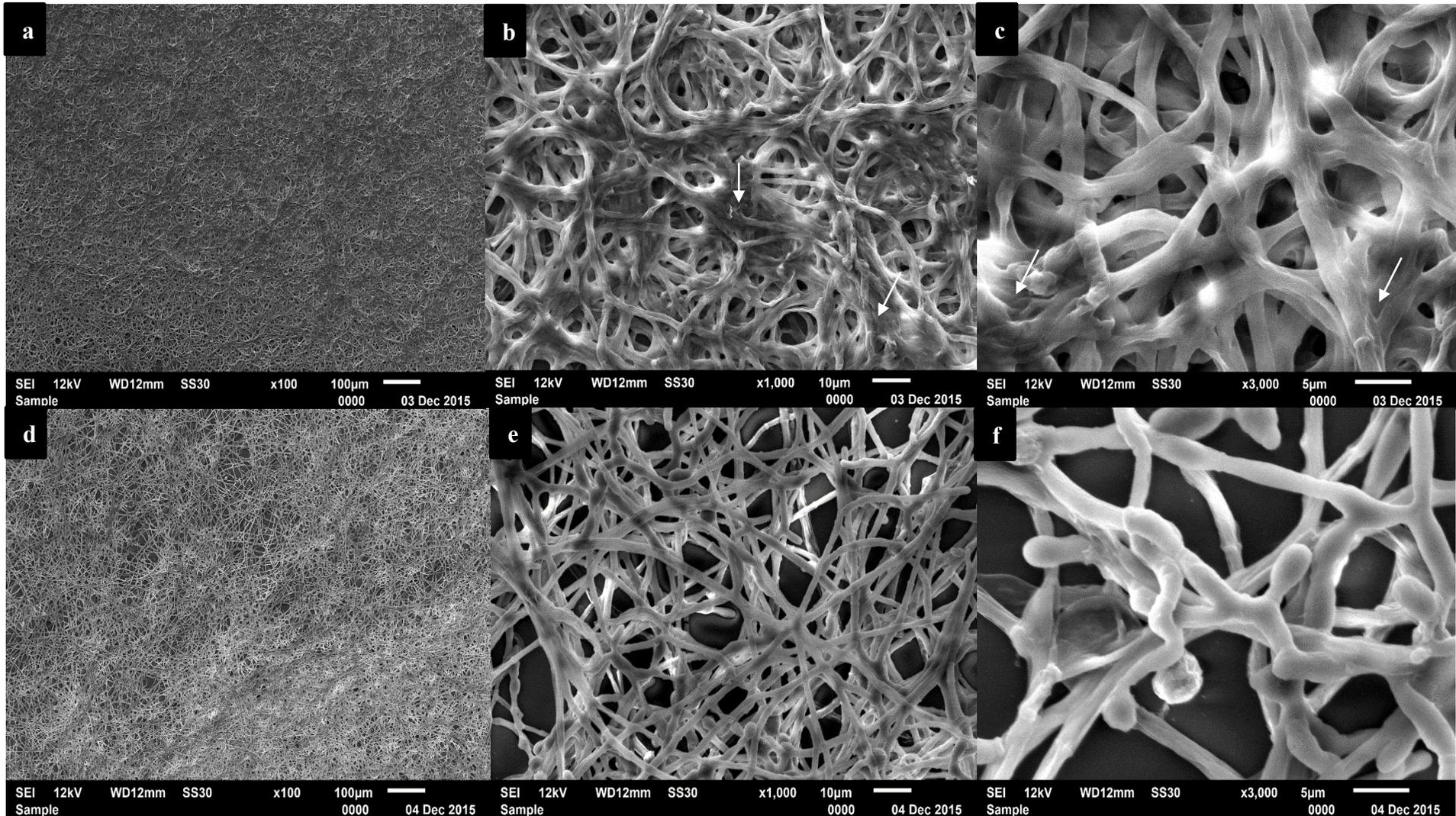


Figura 64. Microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes maduros de *T. rubrum* ATCC MYA-4438 (a, b e c) e do isolado clínico (d, e e f), tratados com efinaconazol, na concentração de 320 mg/L. As setas denotam a matriz extracelular polimérica. É possível observar em ambos os biofilmes, hifas intactas intercalando-se com hifas danificadas e com as paredes celulares colabadas. Um maior dano é observado nos biofilmes do isolado clínico, que apresenta muitas hifas com paredes celulares colabadas e com provável extravasamento de material intracelular. Observa-se também estruturas intactas, semelhantes a arthroconídios (d, e e f).

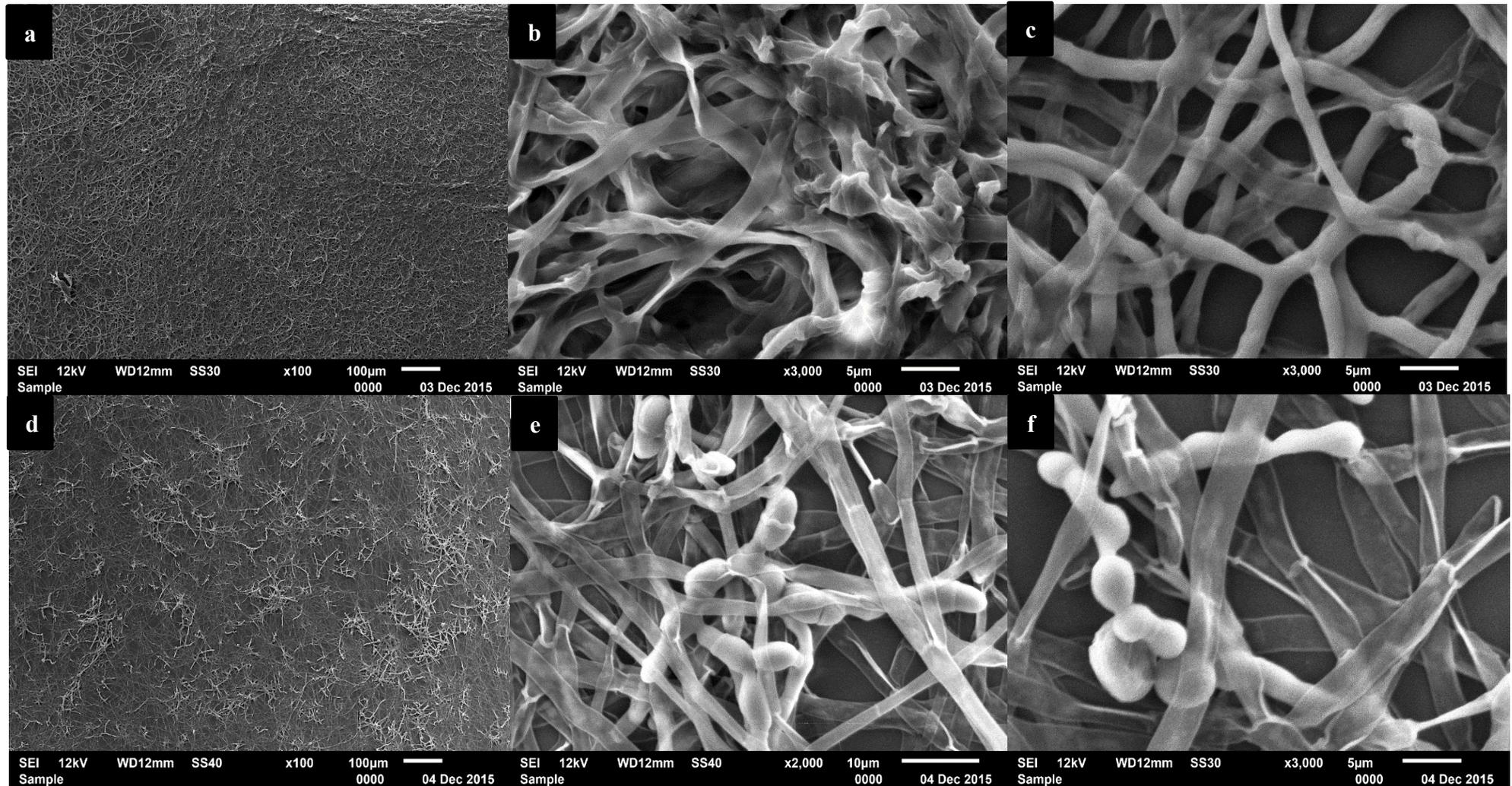
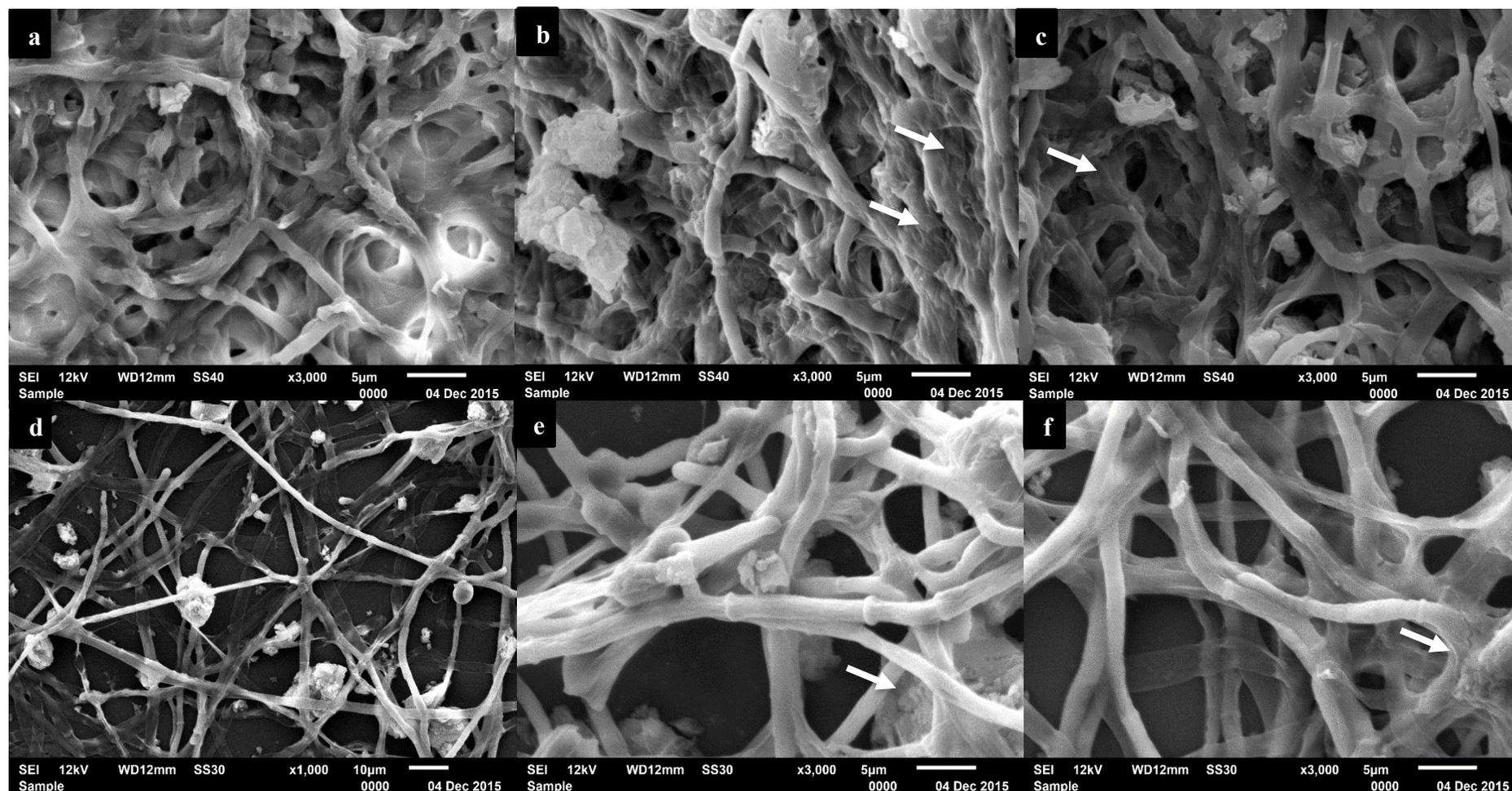


Figura 65. Microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes maduros de *T. rubrum* ATCC MYA-4438 (a, b e c) e do isolado clínico (d, e e f), tratados com NO-np, na concentração de 40 mg/mL. As setas denotam a matriz extracelular polimérica, abundante nos biofilmes da cepa ATCC (b e c). Já os biofilmes da cepa clínica aparentam mais danificados, com maior espaçamento entre as hifas e menor quantidade de matriz extracelular. Observam-se ainda hifas intactas intercalando-se com hifas com paredes celulares colabadas (d, e e f).



7.7.7. Microscopia confocal de varredura a laser

A microscopia confocal dos biofilmes da cepa ATCC e do isolado clínico de *T. rubrum* tratados com efinaconazol e as NO-np foi realizada a fim de verificar a influência do fármaco e das nanopartículas nas espessuras dos biofilmes.

A **Fig 66** mostra os cortes ortogonais em 3D, indicando a espessura dos biofilmes de *T. rubrum* com e sem tratamento, a **Fig 66 A, B e C** representam os biofilmes de *T. rubrum* ATCC MYA-4438 sem tratamento; tratados com NO-np e com efinaconazol, com espessuras de 24, 7 e 7 μm , respectivamente e a **Fig 66 D, E e F** representam os biofilmes do isolado clínico não tratados (27 μm); tratados com NO-np (9 μm) e tratados com o efinaconazol (9 μm). Os resultados indicam que os tratamentos com o fármaco e com as NO-np causaram diminuição na espessura dos biofilmes tanto da cepa ATCC, quanto do isolado clínico.

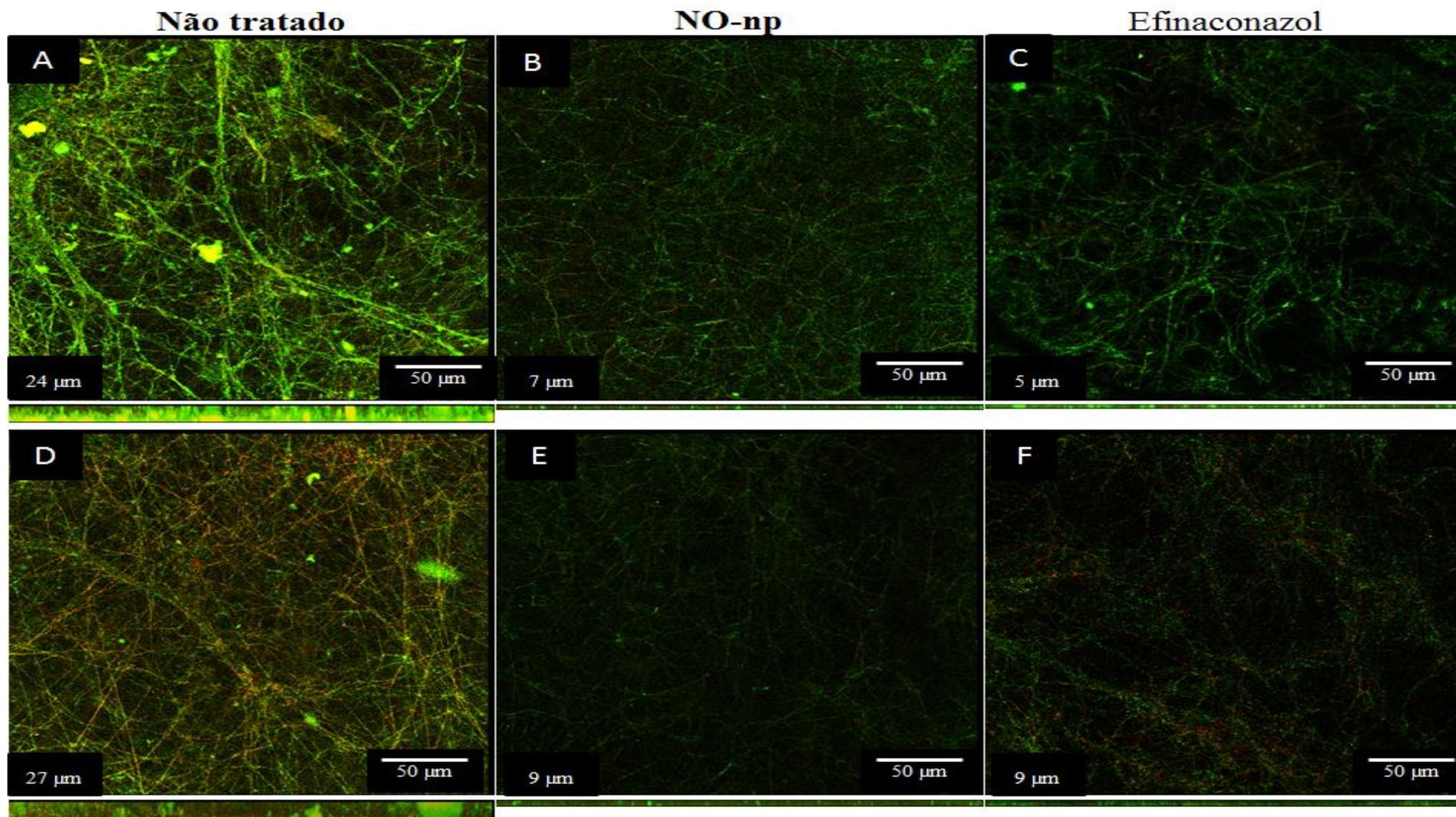
A atividade de nanopartículas de sílica contendo óxido nítrico, descritas por Hetrick e colaboradores (2008), foi verificada previamente contra biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Os resultados mostraram que essas nanopartículas foram capazes de matar 99% dos biofilmes de *P. aeruginosa* e *E. coli*. Uma das explicações para a capacidade anti-biofilme de nanopartículas pode estar relacionada ao seu tamanho, que permite uma penetração mais efetiva entre a matriz extracelular (Hetrick *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, a pesquisa das dermatofitoses tem sido focada basicamente na descoberta de novos fármacos e de novas alternativas para o combate dessas doenças. Por ser uma doença primariamente superficial e com taxa de mortalidade muito baixa, há um certo desinteresse dos pesquisadores em todo o mundo de continuar a pesquisa com esses fungos, por não considerá-los tão importantes quanto outros microrganismos, mesmo com o aumento da incidência e prevalência mundial, além do aumento de relatos de agravamento sistêmico em indivíduos imunocomprometidos. Achterman & White (2012), em seu artigo intitulado “*A foot in the door for dermatophyte research*”,

afirmaram que a pesquisa das dermatofitoses está prestes a decolar, uma vez que o genoma de sete dermatófitos está completamente sequenciado e a sequência encontra-se disponível publicamente. De acordo com eles, esse sequenciamento possivelmente contribuirá para que se tenha a certeza de como os dermatófitos interagem com as células humanas, provocando a doença.

A comprovação da habilidade dos dermatófitos na formação de biofilmes também ratifica a afirmação anterior e abre diversas portas para a pesquisa desses fungos. A capacidade dos biofilmes de serem mais resistentes aos antimicrobianos pode explicar a infecção persistente, a resistência e o tratamento longo que usualmente é requerido nas dermatofitoses, especialmente nas onicomicoses. Sendo assim, os dados gerados nesse trabalho podem contribuir de maneira significativa para a ciência, representando mais um avanço no campo de biofilmes, tanto para a pesquisa de novos fármacos para o tratamento dessas micoses, quanto para a descoberta de novos genes responsáveis pela virulência, além de responder perguntas que há tempos vêm sendo feitas.

Figura 66. Cortes ortogonais em 3D, indicando a espessura dos biofilmes de *T. rubrum* com e sem tratamento. A, B e C representam os biofilmes de *T. rubrum* ATCC MYA-4438 sem tratamento; tratados com NO-np e com efinaconazol, com espessuras de 24, 7 e 7 μm , respectivamente. D, E e F representam os biofilmes do isolado clínico não tratados (27 μm); tratados com NO-np (9 μm) e tratados com o efinaconazol (9 μm). Os tratamentos com o fármaco e com as NO-np causaram diminuição na espessura dos biofilmes da cepa ATCC e do isolado clínico.



Conclusões
(Partes I e II)

8. CONCLUSÕES

A análise dos resultados do presente trabalho nos permitiu concluir que:

- *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* foram capazes de formar biofilmes *in vitro* em diversos meios e 72 horas foi o tempo ideal para a maturação dos biofilmes de ambas as espécies;
- Os protocatecuatos com 4 a 10 carbonos na cadeia lateral foram os que melhor inibiram, *in vitro*, o crescimento das 4 espécies de dermatófitos testadas e demonstraram baixa toxicidade para as células HaCat, NHOK e HepG2, com destaque para nonila, que obteve, no geral, o melhor índice de seletividade;
- As células planctônicas nas mesmas concentrações dos biofilmes tiveram seu crescimento inibido por todos os fármacos testados e pelo composto nonila. Os biofilmes pré-formados foram sensíveis somente ao protocatecuato de nonila e resistentes a todos os fármacos avaliados;
- A combinação entre a terbinafina e nonila resultou em interação indiferente nas células de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*.
- As nanopartículas de óxido nítrico apresentaram atividade tanto para as células planctônicas, quanto em formato biofilme, obtendo um comportamento fungistático;
- O efinaconazol mostrou-se mais eficaz que a terbinafina e o fluconazol e apresentou interação sinérgica quando combinado com as NO-np's.

Referências Bibliográficas

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAHMAN, S. M. Strain differentiation of dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 319-33, 2008 Nov-Dec 2008.

ACHTERMAN, R. R.; WHITE, T. C. A foot in the door for dermatophyte research. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 3, p. e1002564, 2012.

_____. Dermatophyte Virulence Factors: Identifying and analyzing genes that may contribute to chronic or acute skin infections **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 1-8, 2012.

AJELLO, L. Natural history of the dermatophytes and related fungi. **Mycopathol Mycol Appl**, v. 53, n. 1, p. 93-110, Aug 30 1974.

AJESH, K.; SREEJITH, K. *Cryptococcus laurentii* biofilms: structure, development and antifungal drug resistance. **Mycopathologia**, v. 174, n. 5-6, p. 409-19, Dec 2012.

ALBUQUERQUE P. C., NAKAYASU E. S., RODRIGUES M. L., FRASES S., CASADEVALL A., ZANCOPE-OLIVEIRA R. M., ALMEIDA I. C., NOSANCHUK J. D. Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. **Cell Microbiol**. v. 10 n.8, p. 1695-710, 2008.

ALTSCHUL S. F., GISH W., MILLER W., MYERS E. W., LIPMAN D. J. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**, v. 215, n. 3, p. 403-10, 1990.

AQUINO, V. R.; CONSTANTE, C. C.; BAKOS, L. Frequency of dermatophytosis in mycological examinations at a general hospital in Porto Alegre, Brazil **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 3, p. 239-244, 2007.

ARAÚJO R. C., NEVES F. A., FORMAGIO A. S., KASSUYA C. A., STEFANELLO M. E., SOUZA V. V., PAVAN F. R., CRODA J. Evaluation of the anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity and *in vivo* acute toxicity of *Annona sylvatic*. **BMC Complement Altern Med**. v. 14, p. 209, 2014.

ARAÚJO S. M., FONTES C. J., LEITE JÚNIOR D. P., HAHN R. C. Fungal agents in different anatomical sites in Public Health Services in Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. v. 54, n. 1, p. 5-10, Jan-Feb 2012.

ARAÚJO, S. A. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; DANTAS, V. M.; MIRANDA, A. M.; LIMA, F. E. S.; MELO, V. S. P.; RICARTE, A. R. F.; COSTA, E. C. Avaliação *in vitro* da atividade citotóxica de drogas antivirais em fibroblastos caprinos. **Ciência Animal**, v. 18, n. 1, p. 25-31, 2008.

BAEZA, L. C.; GIANNINI, M. J. Strain differentiation of *Trichophyton rubrum* by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 46, n. 6, p. 339-41, 2004 Nov-Dec 2004.

BAEZA, L. C.; MATSUMOTO, M. T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Strain differentiation of *Trichophyton rubrum* by randomly amplified polymorphic DNA and analysis of rDNA nontranscribed spacer. **J Med Microbiol**, v. 55, n. Pt 4, p. 429-36, Apr 2006.

BALDO, A., MONOD M., MATHY A., CAMBIER L., BAGUT E. T., DEFAWEUX V., SYMOENS F., ANTOINE N., MIGNON B. Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes. **Mycoses**, v. 55, n. 3, p. 218-23, May 2012.

BARCHIESI, F.; FALCONI DI FRANCESCO, L.; SCALISE, G. *In vitro* activities of terbinafine in combination with fluconazole and itraconazole against isolates of *Candida albicans* with reduced susceptibility to azoles. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 41, n. 8, p. 1812-4, Aug 1997.

BALFOUR, J. A.; FAULDS, D. Terbinafine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in superficial mycoses. **Drugs**, v. 43, n. 2, p. 259-84, 1992.

BIANCALANA F. S., LYRA L., MORETTI M. L., SCHREIBER A. Z. Susceptibility testing of terbinafine alone and in combination with amphotericin B, itraconazole, or voriconazole against conidia and hyphae of dematiaceous molds. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 71, n. 4, p. 378-85, Dec 2011.

BOJSEN, R. K.; ANDERSEN, K. S.; REGENBERG, B. *Saccharomyces cerevisiae*--a model to uncover molecular mechanisms for yeast biofilm biology. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 65, n. 2, p. 169-82, Jul 2012.

BRILHANTE, R. S.; CORDEIRO, R. A.; GOMES, J. M.; SIDRIM, J. J.; ROCHA, M. F. Canine dermatophytosis caused by an anthropophilic species: molecular and phenotypical characterization of *Trichophyton tonsurans*. **J Med Microbiol**, v. 55, n. Pt 11, p. 1583-6, Nov 2006.

BRILHANTE, R. S.; PAIXÃO, G. C.; SALVINO, L. K.; DIÓGENES, M. J.; BANDEIRA, S. P.; ROCHA, M. F.; DOS SANTOS, J. B.; SIDRIM, J. J. Epidemiology and ecology of dermatophytoses in the City of Fortaleza: *Trichophyton tonsurans* as important emerging pathogen of Tinea capitis]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 33, n. 5, p. 417-25, Sep-Oct 2000.

BRISTOW, I. Onychomycosis – a review of its presentation and treatment **British Journal of Podiatry**, v. 7, n. 3, p. 64–67, 2004.

BROWN, L.; WOLF, J. M.; PRADOS-ROSALES, R.; CASADEVALL, A. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. **Nat Rev Microbiol**, v. 13, n. 10, p. 620-30, Oct 2015.

BURKHART, C. N.; BURKHART, C. G.; GUPTA, A. K. Dermatophytoma: Recalcitrance to treatment because of existence of fungal biofilm. **J Am Acad Dermatol**, v. 47, n. 4, p. 629-31, Oct 2002.

BUTTS, A.; KRYSAN, D. J. Antifungal drug discovery: something old and something new. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 9, p. e1002870, Sep 2012.

CAMPBELL, I.; CAMPBELL, G.; AGUIRRE, L.; SANTOS, M. G. Dermatofitos em Brasília. **An Bras Dermatol**, v. 59, n. 5, p. 224-225, 1984.

CANTON, E.; PEMÁN, J.; VIUDES, A.; QUINDÓS, G.; GOBERNADO, M.; ESPINEL-INGROFF, A. Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida* species. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 45, n. 3, p. 203-6, 2003.

CHANG, W.; DING, D.; ZHANG, S.; DAI, Y.; PAN, Q.; LU, H.; LUO, Q.; SHEN, J.; MA, X. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Grown on Vancomycin-Supplemented Screening Agar Displays Enhanced Biofilm Formation. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 12, p. 7906-10, 2015.

CHATURVEDI, V.; RAMANI, R.; ANDES, D.; DIEKEMA, D. J.; PFALLER, M. A.; GHANNOUM, M. A.; KNAPP, C.; LOCKHART, S. R.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; WALSH, T.J.; MARCHILLO, K.; MESSER, S.; WELSHENBAUGH, A. R.; ASTULLI, C.; IQBAL, N. PAETZNICK VL, RODRIGUEZ J, SEIN T. Multilaboratory testing of two-drug combinations of antifungals against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida parapsilosis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 4, p. 1543-8, Apr 2011.

CHINELLI, P. A.; SOFIATTI, A.; NUNES, R. S.; MARTINS, J. E. Dermatophyte agents in the city of Sao Paulo, from 1992 to 2002. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 45, n. 5, p. 259-63, Sep-Oct 2003.

CHOUDHARY, S., KUSUM DEVI, V. Potential of nanotechnology as a delivery platform against tuberculosis: current research review. **J Control Release**, v. 28, n. 202, p. 65-75, 2015.

CHRISTENSEN, G. D.; SIMPSON, W. A.; YOUNGER, J. J.; BADDOUR, L. M.; BARRETT, F. F., MELTON, D. M., BEACHEY, E. H. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. **J Clin Microbiol**, v. 22, n. 6, p. 996-1006, Dec 1985.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved Standard - Second Edition. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute 2008a.

_____. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard - third edition. CLSI document M27-A3 .** Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute 2008b.

COELHO, L. M.; AQUINO-FERREIRA, R., MAFFEI, C. M., MARTINEZ-ROSSI, N. M. *In vitro* antifungal drug susceptibilities of dermatophytes microconidia and arthroconidia. **J Antimicrob Chemother**, v. 62, n. 4, p. 758-61, Oct 2008.

COLOMBO, A. L.; PADOVAN, A. C.; CHAVES, G. M. Current knowledge of *Trichosporon* spp. and Trichosporonosis. **Clin Microbiol Rev**, v. 24, n. 4, p. 682-700, Oct 2011.

COSTA, M.; PASSOS, X. S., HASIMOTO E SOUZA, L. K.; MIRANDA, A. T.; LEMOS, A.; OLIVEIRA, J. G.; SILVA, R. Epidemiology and etiology of dermatophytosis in Goiania, GO, Brazil. In: (Ed.). **Rev Soc Bras Med Trop**. Brazil, v.35, p.19-22, 2002.

COSTA-ORLANDI, C. B.; MAGALHÃES, G. M.; OLIVEIRA, M. B.; TAYLOR, E. L.; MARQUES, C. R.; RESENDE-STOIANOFF, M. A. Prevalence of dermatomycosis in a Brazilian tertiary care hospital. **Mycopathologia**, v. 174, n. 5-6, p. 489-97, Dec 2012.

COSTA-ORLANDI, C. B.; SARDI, J. C.; SANTOS, C. T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. *In vitro* characterization of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* biofilms. **Biofouling**, v. 30, n. 6, p. 719-27, Jul 2014.

COWAN, M. M.; WARREN, T. M.; FLETCHER, M. Mixed-species colonization of solid surfaces in laboratory biofilms. **Biofouling**, v. 3, n. 1, p. 23-34, 1991.

DE PAULA E SILVA, A. C.; OLIVEIRA, H. C.; SILVA, J. F.; SANGALLI-LEITE, F.; SCORZONI, L.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. Microplate alamarBlue assay for *Paracoccidioides* susceptibility testing. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 4, p. 1250-2, Apr 2013.

DE PAULA, E. S. A. C.; COSTA-ORLANDI, C. B.; GULLO, F. P.; SANGALLI-LEITE, F.; DE OLIVEIRA HC, DA SILVA JDE F, SCORZONI L, PITANGUI NDE S, ROSSI SA, BENADUCCI T, WOLF VG, REGASINI LO, PETRÔNIO MS, SILVA DH, BOLZANI VS, FUSCO-ALMEIDA AM, MENDES-GIANNINI MJ. Antifungal Activity of Decyl Gallate against Several Species of Pathogenic Fungi. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2014, p. 506273, 2014.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg Infect Dis**, v. 8, n. 9, p. 881-90, Sep 2002.

DOS SANTIOS, J. I.; NEGRI, C. M.; WAGNER, D. C.; PHILIPI, R.; NAPPI, B. P.; COELHO, M. P. Some aspects of dermatophytoses seen at University Hospital in Florianopolis, Santa Catarina, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 39, n. 3, p. 137-40, May-Jun 1997.

ECKERT, J. C.; ERTAS, B.; FALK, T. M.; METZE, D.; BÖER-AUER, A. Species identification of dermatophytes in paraffin-embedded biopsies with a new PCR-assay targeting the ITS 2 region and comparison with histopathological features. **Br J Dermatol**, Nov 11 2015.

EGUSA, M.; IWAMOTO, R.; IZAWA, H.; MORIMOTO, M.; SAIMOTO, H.; KAMINAKA, H.; IFUKU, S. Characterization of Chitosan Nanofiber Sheets for Antifungal Application. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 11, p. 26202-10, 2015.

ENDO, E. H.; COSTA, G. M.; NAKAMURA, T. U.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Antidermatophytic activity of hydroalcoholic extracts from *Rosmarinus officinalis* and *Tetradenia riparia*. **J Mycol Med**, Oct 22 2015.

ESCOBAR, M. L.; AFONSO, R. P. A.; ARISTIZABAL, G. A. F. .Valoración de dos métodos de tinción en ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares tumorales. **Rev. colomb. biotecnol**, v. 11, n. 2, p. 49-56, 2009.

FANNING, S.; MITCHELL, A. P. Fungal biofilms. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 4, p. e1002585, 2012.

FENG, X.; XIE, J.; ZHUANG, K.; RAN, Y. Efficacy and tolerability of luliconazole cream 1% for dermatophytoses: a meta-analysis. **J Dermatol**, v. 41, n. 9, p. 779-82, Sep 2014.

FIGUEREDO, L. A.; CAFARCHIA, C.; DESANTIS, S.; OTRANTO, D. Biofilm formation of *Malassezia pachydermatis* from dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 160, n. 1-2, p. 126-131, 2012.

FITZPATRICK, F.; HUMPHREYS, H.; SMYTH, E.; KENNEDY, C. A.; O'GARA, J. P. Environmental regulation of biofilm formation in intensive care unit isolates of *Staphylococcus epidermidis*. **J Hosp Infect**, v. 52, n. 3, p. 212-8, Nov 2002.

FRIEDMAN, A. J.; HAN, G.; NAVATI, M. S.; CHACKO, M.; GUNTHER, L.; ALFIERI, A.; FRIEDMAN, J. M. Sustained release nitric oxide releasing nanoparticles: characterization of a novel delivery platform based on nitrite containing hydrogel/glass composites. **Nitric Oxide**, v. 19, n. 1, p. 12-20, Aug 2008.

FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 14, p. 12-16, 2000.

FURTADO, M.; THÁRA, T. S.; MAROJA, M. F.; SALEM-JOSÉ, J. I. N.; CASTRILLÓN, A. L. Dermatofitose na cidade de Manaus-AM. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 62, p. 195-196, 1987.

GEHRMANN, U.; QAZI, K. R.; JOHANSSON, C.; HULTENBY, K.; KARLSSON, M.; LUNDEBERG, L.; GABRIELSSON, S.; SCHEYNIUS, A. Nanovesicles from *Malassezia sympodialis* and host exosomes induce cytokine responses--novel mechanisms for host-microbe interactions in atopic eczema. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e21480, 2011.

GHANNOUM, M.; ISHAM, N.; HENRY, W.; KROON, H. A.; YURDAKUL, S. Evaluation of the morphological effects of TDT 067 (terbinafine in Transfersome) and conventional terbinafine on dermatophyte hyphae *in vitro* and *in vivo*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 5, p. 2530-4, May 2012.

GHANNOUM, M.; ISHAM, N.; LONG, L. *In vitro* antifungal activity of ME1111, a new topical agent for onychomycosis, against clinical isolates of dermatophytes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 9, p. 5154-8, Sep 2015.

GHELARDI, E.; CELANDRONI, F.; GUEYE, S. A.; SALVETTI, S.; SENESI, S.; BULGHERONI, A.; MAILLAND, F. Potential of Ergosterol synthesis inhibitors to cause resistance or cross-resistance in *Trichophyton rubrum*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 5, p. 2825-9, May 2014.

GIUDICE, M. C.; REIS-MENEZES, A. A.; RITTNER, G. M.; MOTA, A. J.; GAMBALE, W. Isolation of *Microsporium gypseum* in soil samples from different geographical regions of Brazil, evaluation of the extracellular proteolytic enzymes activities (keratinase and elastase) and molecular sequencing of selected strains. **Braz J Microbiol**, v. 43, n. 3, p. 895-902, Jul 2012.

GOUGHENOUR, K. D.; BALADA-LLASAT, J. M.; RAPPLEYE, C. A. Quantitative Microplate-Based Growth Assay for Determination of Antifungal Susceptibility of *Histoplasma capsulatum* Yeasts. **J Clin Microbiol**, v. 53, n. 10, p. 3286-95, Oct 2015.

GOZUBUYUK, G. S.; AKTAS, E.; YIGIT, N. An ancient plant *Lawsonia inermis* (henna): determination of *in vitro* antifungal activity against dermatophytes species. **J Mycol Med**, v. 24, n. 4, p. 313-8, Dec 2014.

GRASER, Y.; KUIJPERS, A. F.; EL FARI, M.; PRESBER, W.; DE HOOG, G. S. Molecular and conventional taxonomy of the *Microsporium canis* complex. **Med Mycol**, v. 38, n. 2, p. 143-53, Apr 2000.

_____. Molecular taxonomy of *Trichophyton mentagrophytes* and *T. tonsurans*. **Med Mycol**, v. 37, n. 5, p. 315-30, Oct 1999.

_____. Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* complex. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 9, p. 3329-36, Sep 2000.

GROSSMAN, M.; PAPPERT, A. S.; GARZON, M. C.; SILVERS, D. N. Invasive *Trichophyton rubrum* infection in the immunocompromised host: Report of three cases **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 33, p. 315-8, 1995.

GROVER, C.; KHURANA, A. An update on treatment of onychomycosis. **Mycoses**, v. 55, n. 6, p. 541-51, Nov 2012.

GULLO, F. P.; SARDI, J. C., SANTOS, V. A., SANGALLI-LEITE, F.; PITANGUI, N. S.; ROSSI, S. A.; DE PAULA E SILVA, A. C.; SOARES, L. A.; SILVA, J. F.; OLIVEIRA, H. C.; FURLAN, M.; SILVA, D. H.; BOLZANI, V. S.; MENDES-GIANNINI, M. J., FUSCO-ALMEIDA, A. M. Antifungal activity of maytenin and pristimerin. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2012, p. 340787, 2012.

GUPTA, A. K.; COOPER, E. A. Update in antifungal therapy of dermatophytosis. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 353-67, 2008 Nov-Dec 2008.

GUPTA, A. K.; PAQUET, M.; SIMPSON, F. C. Therapies for the treatment of onychomycosis. **Clin Dermatol**, v. 31, n. 5, p. 544-54, 2013 Sep-Oct 2013.

GUPTA, A. K.; SIMPSON, F. C. New therapeutic options for onychomycosis. **Expert Opin Pharmacother**, v. 13, n. 8, p. 1131-42, Jun 2012.

GUPTA, D.; JAIN, D. K. Chalcone derivatives as potential antifungal agents: Synthesis, and antifungal activity. **J Adv Pharm Technol Res**, v. 6, n. 3, p. 114-7, Jul-Sep 2015.

HAN, G.; MARTINEZ, L. R.; MIHU, M. R.; FRIEDMAN, A. J.; FRIEDMAN, J. M.; NOSANCHUK, J. D. Nitric oxide releasing nanoparticles are therapeutic for *Staphylococcus aureus* abscesses in a murine model of infection. **PLoS One**, v. 4, n. 11, p. e7804, 2009.

HARDING, M. W.; MARQUES, L. L.; HOWARD, R. J.; OLSON, M. E. Can filamentous fungi form biofilms? **Trends Microbiol**, v. 17, n. 11, p. 475-80, Nov 2009.

HASHIMOTO, T.; BLUMENTHAL, H. J. Survival and resistance of *Trichophyton mentagrophytes* arthrospores. **Appl Environ Microbiol**, v. 35, n. 2, p. 274-7, Feb 1978.

HAY, R. Superficial fungal infections. **Medicine**, v. 37, n. 11, p. 610-612, 2009.

HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*: comparison of biofilm formation in terms of biomass and activity. **Br J Biomed Sci**, v. 63, n. 1, p. 5-11, 2006.

HETRICK, E. M.; SHIN, J. H.; PAUL, H. S.; SCHOENFISCH, M. H. Anti-biofilm efficacy of nitric oxide-releasing silica nanoparticles. **Biomaterials**, v. 30, n. 14, p. 2782-9, May 2009.

_____. Bactericidal efficacy of nitric oxide-releasing silica nanoparticles. **ACS Nano**, v. 2, n. 2, p. 235-46, Feb 2008.

HRYNCEWICZ-GWOZDZ, A.; KALINOWSKA, K.; PLOMER-NIEZGODA, E.; BIELECKI, J.; JAGIELSKI, T. Increase in resistance to fluconazole and itraconazole in *Trichophyton rubrum* clinical isolates by sequential passages *in vitro* under drug pressure. **Mycopathologia**, v. 176, n. 1-2, p. 49-55, Aug 2013.

HRYNCEWICZ-GWÓZDŹ, A.; JAGIELSKI, T.; DOBROWOLSKA, A.; SZEPIETOWSKI, J. C.; BARAN, E. Identification and differentiation of *Trichophyton rubrum* clinical isolates using PCR-RFLP and RAPD methods. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 30, n. 6, p. 727-31, Jun 2011.

ISHIDA, K.; DE MELLO, J. C.; CORTEZ, D. A.; FILHO, B. P.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. **J Antimicrob Chemother**, v. 58, n. 5, p. 942-9, Nov 2006.

IWATA, A.; WATANABE, Y.; KUMAGAI, N.; KATAFUCHI-NAGASHIMA, M.; SUGIURA, K.; PILLAI, R.; TATSUMI, Y. *In vitro* and *in vivo* assessment of dermatophyte acquired resistance to efinaconazole, a novel triazole antifungal. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 8, p. 4920-2, Aug 2014.

JAHN, B.; STUBEN, A.; BHAKDI, S. Colorimetric susceptibility testing for *Aspergillus fumigatus*: comparison of menadione-augmented 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide and Alamar blue tests. **J Clin Microbiol**, v. 34, n. 8, p. 2039-41, Aug 1996.

JARRATT, M.; SIU, W. J.; YAMAKAWA, E.; KODERA, N.; PILLAI, R.; SMITH, K. Safety and pharmacokinetics of efinaconazole 10% solution in healthy volunteers and patients with severe onychomycosis. **J Drugs Dermatol**, v. 12, n. 9, p. 1010-6, Sep 2013.

JIN, Y.; YIP, H. K.; SAMARANAYAKE, Y. H.; YAU, J. Y.; SAMARANAYAKE, L. P. Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 7, p. 2961-7, Jul 2003.

JO SIU, W. J.; TATSUMI, Y.; SENDA, H.; PILLAI, R.; NAKAMURA, T.; SONE, D.; FOTHERGILL, A. Comparison of *in vitro* antifungal activities of efinaconazole and currently available antifungal agents against a variety of pathogenic fungi associated with onychomycosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, n. 4, p. 1610-6, Apr 2013.

JOHNSON, M. D.; MACDOUGALL, C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PERFECT, J. R.; REX, J. H. Combination antifungal therapy. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 3, p. 693-715, Mar 2004.

JONES, M. L.; GANOPOLSKY, J. G.; LABBÉ, A.; WAHL, C.; PRAKASH, S. Antimicrobial properties of nitric oxide and its application in antimicrobial formulations and medical devices. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 88, n. 2, p. 401-7, Sep 2010.

KANBE, T. Molecular Approaches in the Diagnosis of Dermatophytosis. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 307-317, 2008.

KATAWERA, V.; SIEDNER, M.; BOUM, Y., 2ND. Evaluation of the modified colorimetric resazurin microtiter plate-based antibacterial assay for rapid and reliable tuberculosis drug susceptibility testing. **BMC Microbiol**, v. 14, p. 259, 2014.

KAUFFMAN, C. A.; ZARINS, L. T. Colorimetric method for susceptibility testing of voriconazole and other triazoles against *Candida* species. **Mycoses**, v. 42, n. 9-10, p. 539-42, 1999.

KAUR, R.; KASHYAP, B.; BHALLA, P. Onychomycosis--epidemiology, diagnosis and management. **Indian J Med Microbiol**, v. 26, n. 2, p. 108-16, 2008.

KHAN, M. S.; AHMAD, I. Antifungal activity of essential oils and their synergy with fluconazole against drug-resistant strains of *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 90, n. 3, p. 1083-94, May 2011.

KUBO, I.; FUJITA, K.; NIHEI, K. Molecular design of multifunctional antibacterial agents against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Bioorg Med Chem**, v. 11, n. 19, p. 4255-62, Sep 2003.

KUHN, D. M.; BALKIS, M.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 1, p. 506-8, Jan 2003.

KURTZ, M. B.; HEATH, I. B.; MARRINAN, J.; DREIKORN, S.; ONISHI, J.; DOUGLAS, C. Morphological effects of lipopeptides against *Aspergillus fumigatus* correlate with activities against (1,3)-beta-D-glucan synthase. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 38, n. 7, p. 1480-9, Jul 1994.

KUTNER, A. J.; FRIEDMAN, A. J. Use of nitric oxide nanoparticulate platform for the treatment of skin and soft tissue infections. **Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol**, v. 5, n. 5, p. 502-14, Sep-Oct 2013.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; TAKAHASHI DE MELO, N. **Tratado de micologia médica**. 9ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 829.

LANDRISCINA, A.; ROSEN, J.; FRIEDMAN, A. J. Biodegradable chitosan nanoparticles in drug delivery for infectious disease. **Nanomedicine (Lond)**, v. 10, n. 10, p. 1609-19, May 2015.

LI, Y.; WAN, Z.; LI, R. *In vitro* activities of nine antifungal drugs and their combinations against *Phialophora verrucosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 9, p. 5609-12, Sep 2014.

LIPNER, S. R.; SCHER, R. K. Efinaconazole in the treatment of onychomycosis. **Infect Drug Resist**, v. 8, p. 163-72, 2015.

MACHADO VILA, T. V.; SOUSA QUINTANILHA, N.; ROZENTAL, S. Miltefosine is effective against *Candida albicans* and *Fusarium oxysporum* nail biofilms *in vitro*. **J Med Microbiol**, v. 64, n. 11, p. 1436-49, Nov 2015.

MACHERLA, C.; SANCHEZ, D. A.; AHMADI, M. S.; VELLOZZI, E. M.; FRIEDMAN, A. J.; NOSANCHUK, J. D.; MARTINEZ, L. R. Nitric oxide releasing nanoparticles for treatment of *Candida albicans* burn infections. **Front Microbiol**, v. 3, p. 193, 2012.

MACURA, A. B.; KRZYŚCIAK, P.; SKÓRA, M.; GNIADEK, A. Dermatophyte species in superficial mycoses in the Krakow district, Poland in the years 1972-2007. **Mycoses**, v. 53, n. 2, p. 148-52, Mar 1 2010.

- MAKIMURA, K.; MOCHIZUKI, T.; HASEGAWA, A.; UCHIDA, K.; SAITO, H.; YAMAGUCHI, H. Phylogenetic classification of *Trichophyton mentagrophytes* complex strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 9, p. 2629-33, Sep 1998.
- MARCHI, M. S.; CARVALHO, M. T. F.; PEREIRA, C. A. C.; MODESTO, B. Incidência de dermatófitos em Juiz de Fora, Minas Gerais. **An Bras Dermatol**, v. 58, p. 253-6, 1983.
- MARCOS-ZAMBRANO, L. J.; ESCRIBANO, P.; BOUZA, E.; GUINEA, J. Susceptibility of *Candida albicans* biofilms to caspofungin and anidulafungin is not affected by metabolic activity or biomass production. **Med Mycol**, v. 54, n. 2, p. 155-61, Feb 1 2016.
- MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 3, p. 1021-33, Mar 2006.
- MARTINEZ, L. R.; HAN, G.; CHACKO, M.; MIHU, M. R.; JACOBSON, M.; GIALANELLA, P.; FRIEDMAN, A. J.; NOSANCHUK, J. D.; FRIEDMAN, J. M. Antimicrobial and healing efficacy of sustained release nitric oxide nanoparticles against *Staphylococcus aureus* skin infection. **J Invest Dermatol**, v. 129, n. 10, p. 2463-9, Oct 2009.
- MARTINEZ, L. R.; MIHU, M. R.; HAN, G.; FRASES, S.; CORDERO, R. J.; CASADEVALL, A.; FRIEDMAN, A. J.; FRIEDMAN, J. M.; NOSANCHUK, J. D. The use of chitosan to damage *Cryptococcus neoformans* biofilms. **Biomaterials**, v. 31, n. 4, p. 669-79, Feb 2010.
- MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T.; ROSSI, A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 369-83, 2008 Nov-Dec 2008.
- MARTINS, C. V.; DA SILVA, D. L.; NERES, A. T.; MAGALHÃES, T. F.; WATANABE, G. A.; MODOLO, L. V.; SABINO, A. A.; DE FÁTIMA, A.; DE RESENDE, M. A. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. **J Antimicrob Chemother**, v. 63, n. 2, p. 337-9, Feb 2009.
- MARTINS, J. E.; CORIM, S. M.; ARRIAGADA, G. L.; DE MELO, N. T.; HEINS, E. M. *In vitro* sensitivity of dermatophytes to urea. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 61, n. 1, p. 9-14, Feb 2006.
- MARTINS, M.; HENRIQUES, M.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; OLIVEIRA, R. Addition of DNase improves the *in vitro* activity of antifungal drugs against *Candida albicans* biofilms. **Mycoses**, v. 55, n. 1, p. 80-5, Jan 2012.
- MENDEZ-TOVAR, L. J.; MANZANO-GAYOSSO, P.; VELÁSQUEZ-HERNÁNDEZ, V.; MILLAN-CHIU, B.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, F.; MONDRAGÓN-GONZÁLEZ, R.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, R. Resistance to azolic compounds in clinical *Trichophyton* spp. strains. **Rev Iberoam Micol**, v. 24, n. 4, p. 320-2, Dec 31 2007.
- MERKL, R.; HRÁDKOVÁ, I.; FILIP, V.; ŠMIDRKAL, J. Antimicrobial and Antioxidant Properties of Phenolic Acids Alkyl Esters. **Czech J. Food Sci.**, v. 28, n. 4, p. 275-279, 2010.
- MIRANI, Z. A.; KHAN, M. N.; AZIZ, M.; ASADULLAH; NAZ, S.; KHAN, S. I. Effect of stress on biofilm formation by icaA positive and negative strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **J Coll Physicians Surg Pak**, v. 22, n. 1, p. 10-4, Jan 2012.

MOLINA DE DIEGO, A. Clinical, diagnostic and therapeutic aspects of dermatophytosis. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 29 Suppl 3, p. 33-9, Mar 2011.

MONTEIRO, M. C.; DE LA CRUZ, M.; CANTIZANI, J.; MORENO, C.; TORMO, J. R.; MELLADO, E.; DE LUCAS, J. R.; ASENSIO, F.; VALIANTE, V.; BRAKHAGE, A. A.; LATGÉ, J. P.; GENILLOUD, O.; VICENTE, F. A new approach to drug discovery: high-throughput screening of microbial natural extracts against *Aspergillus fumigatus* using resazurin. **J Biomol Screen**, v. 17, n. 4, p. 542-9, Apr 2012.

MORAES, M. A. P.; MACHADO, A. A. L.; FILHO, P. M.; REIS, C. M. S. **Pseudomicetoma dermatofítico: relato de um caso devido a *Trichophyton tonsurans*.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* [online]. . 34: 291-294 p. 2001.

MOWAT, E.; BUTCHER, J.; LANG, S.; WILLIAMS, C.; RAMAGE, G. Development of a simple model for studying the effects of antifungal agents on multicellular communities of *Aspergillus fumigatus*. **J Med Microbiol**, v. 56, n. Pt 9, p. 1205-12, Sep 2007.

_____. The characteristics of *Aspergillus fumigatus* mycetoma development: is this a biofilm? **Med Mycol**, v. 47 Suppl 1, p. S120-6, 2009.

MUKHERJEE, P. K.; LEIDICH, S. D.; ISHAM, N.; LEITNER, I.; RYDER, N. S.; GHANNOUM, M. A. Clinical *Trichophyton rubrum* strain exhibiting primary resistance to terbinafine. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 1, p. 82-6, Jan 2003.

MUSZKIETA, L.; BEAUVAIS, A.; PÄHTZ, V.; GIBBONS, J. G.; ANTON LEBERRE, V.; BEAU, R.; SHIBUYA, K.; ROKAS, A.; FRANCOIS, J. M.; KNIEMEYER, O.; BRAKHAGE, A. A.; LATGÉ, J. P. Investigation of *Aspergillus fumigatus* biofilm formation by various "omics" approaches. **Front Microbiol**, v. 4, p. 13, 2013.

NARDONI, S.; GIOVANELLI, S.; PISTELLI, L.; MUGNAINI, L.; PROFILI, G.; PISSERI, F.; MANCIANTI, F. *In Vitro* Activity of Twenty Commercially Available, Plant-Derived Essential Oils against Selected Dermatophyte Species. **Nat Prod Commun**, v. 10, n. 8, p. 1473-8, Aug 2015.

NAZIK, H.; PENNER, J. C.; FERREIRA, J. A.; HAAGENSEN, J. A.; COHEN, K.; SPORMANN, A. M.; MARTINEZ, M.; CHEN, V.; HSU, J. L.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A. Effects of Iron Chelators on the Formation and Development of *Aspergillus fumigatus* Biofilm. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 10, p. 6514-20, Oct 2015.

NEJI, S.; MAKNI, F.; CHEIKHROUHOU, F.; SELLAMI, A.; SELLAMI, H.; MARRECKCHI, S.; TURKI, H.; AYADI, A. Epidemiology of dermatophytoses in Sfax, Tunisia. **Mycoses**, v. 52, n. 6, p. 534-8, Nov 2009.

NETT, J. E.; GUTE, K. M.; RINGEISEN, A.; HOLOYDA, K. A.; ANDES, D. R. Reduced biocide susceptibility in *Candida albicans* biofilms. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 9, p. 3411-3, Sep 2008.

NEWPORT, G.; KUO, A.; FLATTERY, A.; GILL, C.; BLAKE, J. J.; KURTZ, M. B.; ABRUZZO, G. K.; AGABIAN, N. Inactivation of Kex2p diminishes the virulence of *Candida albicans*. **J Biol Chem**, v. 278, n. 3, p. 1713-20, Jan 17 2003.

NGWOGU, A. C.; OTOKUNEFOR, T. V. Epidemiology of dermatophytoses in a rural community in Eastern Nigeria and review of literature from Africa. **Mycopathologia**, v. 164, n. 4, p. 149-58, Oct 2007.

NIHEI, K.; NIHEI, A.; KUBO, I. Rational design of antimicrobial agents: antifungal activity of alk(en)yl dihydroxybenzoates and dihydroxyphenyl alkanoates. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 13, n. 22, p. 3993-6, Nov 2003.

NIR-PAZ, R.; ELINAV, H.; PIERARD, G. E.; WALKER, D.; MALY, A.; SHAPIRO, M.; BARTON, R. C.; POLACHECK, I. Deep Infection by *Trichophyton rubrum* in an immunocompromised patient. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5298-301, 2003.

NOVICK, N.; TAPIA, L.; BOTTONE, E. Invasive *Trichophyton rubrum* Infection in an immunocompromised Host. **The American Journal of Medicine**, v. 82, p. 321-25, 1987.

NYILASI, I.; KOCSUBÉ, S.; KRIZSÁN, K.; GALGÓCZY, L.; PAPP, T.; PESTI, M.; NAGY, K.; VÁGVÖLGYI, C. Susceptibility of clinically important dermatophytes against statins and different statin-antifungal combinations. **Med Mycol**, v. 52, n. 2, p. 140-8, Feb 2014.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur J Biochem**, v. 267, n. 17, p. 5421-6, Sep 2000.

OSBORNE, C. S.; HOFBAUER, B.; FAVRE, B.; RYDER, N. S. *In vitro* analysis of the ability of *Trichophyton rubrum* to become resistant to terbinafine. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 11, p. 3634-6, Nov 2003.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 8, p. 2720-2, Aug 2002.

PARMAR, R.; MISRA, R.; MOHANTY, S. *In vitro* controlled release of Rifampicin through liquid-crystalline folate nanoparticles. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v.1, n. 129, p. 198-205, 2015.

PATEL, T.; DHILLON, S. Efinaconazole: first global approval. **Drugs**, v. 73, n. 17, p. 1977-83, Nov 2013.

PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **J Microbiol Methods**, v. 72, n. 2, p. 157-65, Feb 2008.

PEIQIAN, L.; XIAOMING, P.; HUIFANG, S.; JINGXIN Z.; NING, H.; BIRUN, L. Biofilm formation by *Fusarium oxysporum* and susceptibility to environmental stress. **FEMS Microbiol Lett**, Oct 24 2013.

PERCIVAL, S. L.; EMANUEL, C.; CUTTING, K. F.; WILLIAMS, D. W. Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection. **Int Wound J**, v. 9, n. 1, p. 14-32, Feb 2012.

PERDONI, F.; SIGNORELLI, P.; CIRASOLA, D.; CARETTI, A.; GALIMBERTI, V.; BIGGIOGERA, M.; GASCO, P.; MUSICANTI, C.; MORACE, G.; BORGHI, E. Antifungal activity of Myriocin on clinically relevant *Aspergillus fumigatus* strains producing biofilm. **BMC Microbiol**, v. 15, p. 248, 2015.

PEREIRA FDE, O.; MENDES, J. M.; LIMA, I. O.; MOTA, K. S.; OLIVEIRA, W. A.; LIMA EDE, O. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. **Pharm Biol**, v. 53, n. 2, p. 228-34, Feb 2015.

PETINATAUD, D.; BERGER, S.; CONTET-AUDONNEAU, N.; MACHOUART, M. Molecular diagnosis of onychomycosis. **J Mycol Med**, v. 24, n. 4, p. 287-95, Dec 2014.

PIERCE, C. G.; UPPULURI, P.; TRISTAN, A. R.; WORMLEY, F. L. JR.; MOWAT, E.; RAMAGE, G.; LOPEZ-RIBOT, J. L. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nat Protoc**, v. 3, n. 9, p. 1494-500, 2008.

PINHEIRO, A. D. Q.; MOREIRA, J. L. B.; SIDRIM, J. J. C. Dermatofitoses no meio urbano e a coexistência do homem com cães e gatos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, p. 287-294, 1997.

PIRES, C.; CRUZ, N. F.; LOBATO, A. M.; SOUSA, P. O.; CARNEIRO, F. R.; MENDES, A. M. Clinical, epidemiological, and therapeutic profile of dermatophytosis. **An Bras Dermatol**, v. 89, n. 2, p. 259-65, Mar-Apr 2014.

PIRES, R. H.; MONTANARI, L. B.; MARTINS, C. H.; ZAIA, J. E.; ALMEIDA, A. M.; MATSUMOTO, M. T.; MENDES-GIANNINI, M. J. Anticandidal efficacy of cinnamon oil against planktonic and biofilm cultures of *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis*. **Mycopathologia**, v. 172, n. 6, p. 453-64, Dec 2011.

_____. *Candida parapsilosis* complex water isolates from a haemodialysis unit: biofilm production and in vitro evaluation of the use of clinical antifungals. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 6, p. 646-54, Sep 2011.

PITANGUI, N. S.; SARDI, J. C.; SILVA, J. F.; BENADUCCI, T.; MORAES DA SILVA, R. A.; RODRÍGUEZ-ARELLANES, G.; TAYLOR, M. L.; MENDES-GIANNINI, M. J.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. Adhesion of *Histoplasma capsulatum* to pneumocytes and biofilm formation on an abiotic surface. **Biofouling**, v. 28, n. 7, p. 711-8, 2012.

PUJOL, I.; CAPILLA, J.; FERNÁNDEZ-TORRES, B.; ORTONEDA, M.; GUARRO, J. Use of the sensititre colorimetric microdilution panel for antifungal susceptibility testing of dermatophytes. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 7, p. 2618-21, Jul 2002.

RAMAGE, G.; MOWAT, E.; JONES, B.; WILLIAMS, C.; LOPEZ-RIBOT, J. Our current understanding of fungal biofilms. **Crit Rev Microbiol**, v. 35, n. 4, p. 340-55, 2009.

_____. Fungal biofilm resistance. **Int J Microbiol**, v. 2012, p. 528521, 2012.

RAMAGE, G.; ROBERTSON, S. N.; WILLIAMS, C. Strength in numbers: antifungal strategies against fungal biofilms. **Int J Antimicrob Agents**, v. 43, n. 2, p. 114-20, Feb 2014.

RAMAGE, G.; MOWAT, E.; JONES, B.; WILLIAMS, C.; LOPEZ-RIBOT, J. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. **Rev Iberoam Micol**, v. 18, n. 4, p. 163-70, Dec 2001.

RIVERA, Z. S.; LOSADA, L.; NIERMAN, W. C. Back to the future for dermatophyte genomics. **MBio**, v. 3, n. 6, 2012.

ROBERT, R.; PIHET, M. Conventional methods for the diagnosis of dermatophytosis. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 295-306, Nov-Dec 2008.

RODWELL, G. E.; BAYLES, C. L.; TOWERSEY, L.; ALY, R. The prevalence of dermatophyte infection in patients infected with human immunodeficiency virus. **Int J Dermatol**, v. 47, n. 4, p. 339-43, Apr 2008.

SAENZ, F. J. Identificación de hongos dermatofitos. España: **Revista Iberoamericana de Micología**: 1-11 p. 2001.

SANCHEZ, D. A.; NOSANCHUK, J.; FRIEDMAN, A. The purview of nitric oxide nanoparticle therapy in infection and wound healing. **Nanomedicine (Lond)**, v. 7, n. 7, p. 933-6, Jul 2012.

SANDOE, J. A.; WITHERDEN, I. R.; COVE, J. H.; HERITAGE, J.; WILCOX, M. H. Correlation between enterococcal biofilm formation *in vitro* and medical-device-related infection potential *in vivo*. **J Med Microbiol**, v. 52, n. Pt 7, p. 547-50, Jul 2003.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 74, n. 12, p. 5463-7, Dec 1977.

SANTOS, D. A.; ARAÚJO, R. A.; HAMDAN, J. S.; CISALPINO, P. S. *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale*: genetic diversity among species and strains by random amplified polymorphic DNA method. **Mycopathologia**, v. 169, n. 4, p. 247-55, Apr 2010.

SANTOS, D. A.; HAMDAN, J. S. *In vitro* antifungal oral drug and drug-combination activity against onychomycosis causative dermatophytes. **Med Mycol**, v. 44, n. 4, p. 357-62, Jun 2006.

_____. *In vitro* activities of four antifungal drugs against *Trichophyton rubrum* isolates exhibiting resistance to fluconazole. **Mycoses**, v. 50, n. 4, p. 286-9, Jul 2007.

SARDI, J. C.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. *Candida species*: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **J Med Microbiol**, v. 62, n. Pt 1, p. 10-24, Jan 2013.

SARDI, J. C.; PITANGUI, N. S.; VOLTAN, A. R.; BRAZ, J. D.; MACHADO, M. P.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. *In vitro* *Paracoccidioides brasiliensis* biofilm and gene expression of adhesins and hydrolytic enzymes. **Virulence**, v. 6, n. 6, p. 642-51, 2015.

SCHAIRER, D. O.; CHOUAKE, J. S.; NOSANCHUK, J. D.; FRIEDMAN, A. J. The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents. **Virulence**, v. 3, n. 3, p. 271-9, May 2012.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 391-97, 2007.

SEIDLER, M.; SALVENMOSER, S.; MULLER, F. M. *In vitro* effects of micafungin against *Candida* biofilms on polystyrene and central venous catheter sections. **Int J Antimicrob Agents**, v. 28, n. 6, p. 568-73, Dec 2006.

SEIDLER, M. J.; SALVENMOSER, S.; MULLER, F. M. *Aspergillus fumigatus* forms biofilms with reduced antifungal drug susceptibility on bronchial epithelial cells. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 11, p. 4130-6, Nov 2008.

SENGUPTA, J.; SAHA, S.; KHETAN, A.; SARKAR, S. K.; MANDAL, S. M. Effects of lactoferricin B against keratitis-associated fungal biofilms. **J Infect Chemother**, v. 18, n. 5, p. 698-703, Oct 2012.

SHARMA, V.; BHATIA, R. Triazoles in Antifungal Therapy: A Review. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical**, v. 2, p. 417-27, 2011.

SIDRIM, J.; ROCHA, M. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SILVEIRA-GOMES, F.; DE OLIVEIRA, E. F.; NEPOMUCENO, L. B.; PIMENTEL, R. F.; MARQUES-DA-SILVA, S. H.; MESQUITA-DA-COSTA, M. Dermatophytosis diagnosed at the Evandro Chagas Institute, Para, Brazil. **Braz J Microbiol**, v. 44, n. 2, p. 443-6, 2013.

SIMITSOPOULOU, M.; PESHKOVA, P.; TASINA, E.; KATRAGKOU, A.; KYRPITZI, D.; VELEGRAKI, A.; WALSH, T. J.; ROILIDES, E. Species-specific and drug-specific differences in susceptibility of *Candida* biofilms to echinocandins: characterization of less common bloodstream isolates. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, n. 6, p. 2562-70, Jun 2013.

SIMONETTI, O.; SILVESTRI, C.; ARZENI, D.; CIRIONI, O.; KAMYSZ, W.; CONTE, I.; STAFFOLANI, S.; ORSETTI, E.; MORCIANO, A.; CASTELLI, P.; SCALISE, A.; KAMYSZ, E.; OFFIDANI, A. M.; GIACOMETTI, A.; BARCHIESI, F. *In vitro* activity of the protegrin IB-367 alone and in combination compared with conventional antifungal agents against dermatophytes. **Mycoses**, v. 57, n. 4, p. 233-9, Apr 2014.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **J Natl Cancer Inst**, v. 82, n. 13, p. 1107-12, Jul 1990.

SOARES, L. A.; GULLO, F. P.; SARDI, J. C.; PITANGUI, N. S.; COSTA-ORLANDI, C. B.; SANGALLI-LEITE, F.; SCORZONI, L.; REGASINI, L. O.; PETRÔNIO, M. S.; SOUZA, P. F.; SILVA, D. H.; MENDES-GIANNINI, M. J.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. Anti-*Trichophyton* Activity of Protocatechuates and Their Synergism with Fluconazole. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

SOARES, L. A. **Estudo da atividade dermatofítica de protocatecuatos contra *T. rubrum* e *T. interdigitale***. 2011. Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Araraquara, SP.

SQUEO, R.; BEER, R.; SILVERS, D.; WEITZMAN, I.; GROSSMAN, M. Invasive *Trichophyton rubrum* resembling blastomycosis infection in the immunocompromised host **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 39, p. 379-80, 1998.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **J Microbiol Methods**, v. 40, n. 2, p. 175-9, Apr 2000.

SVETLICHNY G.; KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C.; CUNHA, S. L.; SILVA, F. E.; BUENO, K., POHLMANN, A. R.; FUENTEFRIA, A. M.; GUTERRES, S. S. Solid lipid nanoparticles containing copaiba oil and allantoin: development and role of nanoencapsulation on the antifungal activity. **Pharmazie**, v. 70, n. 3, p. 155-64, 2015.

SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends Microbiol**, v. 9, n. 5, p. 222-7, May 2001.

TATSUMI, Y.; NAGASHIMA, M.; SHIBANUSHI, T.; IWATA, A.; KANGAWA, Y.; INUI, F, SIU WJ, PILLAI R, NISHIYAMA Y. Mechanism of action of efinaconazole, a novel triazole antifungal agent. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, n. 5, p. 2405-9, May 2013.

_____. *In vitro* antifungal activity of KP-103, a novel triazole derivative, and its therapeutic efficacy against experimental plantar tinea pedis and cutaneous candidiasis in guinea pigs. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 5, p. 1493-9, May 2001.

THOMAS, D. P.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; LEE, S. A. A proteomic analysis of secretory proteins of a pre-vacuolar mutant of *Candida albicans*. **J Proteomics**, v. 73, n. 2, p. 342-51, Dec 1 2009.

TOSTI, A. Efinaconazole solution 10%: topical antifungal therapy for toenail onychomycosis. **Cutis**, v. 92, n. 4, p. 203-8, Oct 2013.

VALLEJO, M. C.; MATSUO, A. L.; GANIKO, L.; MEDEIROS, L. C.; MIRANDA, K.; SILVA, L. S.; FREYMÜLLER-HAAPALAINEN, E.; SINIGAGLIA-COIMBRA, R.; ALMEIDA, I. C.; PUCCIA, R. The pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* exports extracellular vesicles containing highly immunogenic alpha-Galactosyl epitopes. **Eukaryot Cell**, v. 10, n. 3, p. 343-51, Mar 2011.

VANDECANDELAERE, I.; VAN ACKER, H.; COENYE, T. A Microplate-Based System as In Vitro Model of Biofilm Growth and Quantification. **Methods Mol Biol**, v. 1333, p. 53-66, 2016.

VARGAS, G.; ROCHA, J. D.; OLIVEIRA, D. L.; ALBUQUERQUE, P. C.; FRASES, S.; SANTOS, S. S.; NOSANCHUK, J. D.; GOMES, A. M.; MEDEIROS, L. C.; MIRANDA, K.; SOBREIRA, T. J.; NAKAYASU, E. S.; ARIGI, E. A.; CASADEVALL, A.; GUIMARAES, A. J.; RODRIGUES, M. L.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; ALMEIDA, I. C.; NIMRICHTER, L. Compositional and immunobiological analyses of extracellular vesicles released by *Candida albicans*. **Cell Microbiol**, v. 17, n. 3, p. 389-407, Mar 2015.

VERMOUT, S.; Tabart J, Baldo A, Mathy A, Losson B, Mignon B. Pathogenesis of dermatophytosis. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 267-75, Nov-Dec 2008.

VESES, V.; RICHARDS, A.; GOW, N. A. Vacuoles and fungal biology. **Curr Opin Microbiol**, v. 11, n. 6, p. 503-10, Dec 2008.

VILA, T. V.; ROZENTAL, S.; DE SA GUIMARAES, C. M. A new model of *in vitro* fungal biofilms formed on human nail fragments allows reliable testing of laser and light therapies against onychomycosis. **Lasers Med Sci**, v. 30, n. 3, p. 1031-9, Apr 2015.

VLASOVA, N.; HAN, A.; ZENILMAN, J. M.; JAMES, G.; LAZARUS, G. S. New horizons for cutaneous microbiology: the role of biofilms in dermatological disease. **Br J Dermatol**, v. 165, n. 4, p. 751-9, Oct 2011.

WALBERG, M.; MØRK, C.; SANDVEN, P.; JORDE, A. T.; BJØRÅS, M.; GAUSTAD, P. 18S rDNA polymerase chain reaction and sequencing in onychomycosis diagnostics. **Acta Derm Venereol**, v. 86, n. 3, p. 223-6, 2006.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R. C. The dermatophytes. **Clin Microbiol Rev**, v. 8, n. 2, p. 240-59, Apr 1995.

WOLF, J. M.; ESPADAS, J.; LUQUE-GARCIA, J.; REYNOLDS, T.; CASADEVALL, A. Lipid Biosynthetic Genes Affect *Candida albicans* Extracellular Vesicle Morphology, Cargo, and Immunostimulatory Properties. **Eukaryot Cell**, v. 14, n. 8, p. 745-54, Aug 2015.

_____. Interaction of *Cryptococcus neoformans* extracellular vesicles with the cell wall. **Eukaryot Cell**, v. 13, n. 12, p. 1484-93, Dec 2014.

YOUNGCHIM, S.; PORNSUWAN, S.; NOSANCHUK, J. D.; DANKAI, W.; VANITTANAKOM, N. Melanogenesis in dermatophyte species *in vitro* and during infection. **Microbiology**, v. 157, n. Pt 8, p. 2348-56, Aug 2011.

ZANE, L. T.; PLATTNER, J.; CHANDA, S.; CORONADO, D.; MERCHANT, T.; ALLEY, M. R.; GUPTA, A. K. Tavaborole topical solution, 5% for the treatment of toenail onychomycosis. **Drugs Today (Barc)**, v. 51, n. 10, p. 599-607, Oct 2015.

ZEICHNER, J. A. New Topical Therapeutic Options in the Management of Superficial Fungal Infections. **J Drugs Dermatol**, v. 14, n. 10, p. s35-41, Oct 1 2015.

ZURITA, J.; HAY, R. J. Adherence of dermatophyte microconidia and arthroconidia to human keratinocytes *in vitro*. **J Invest Dermatol**, v. 89, n. 5, p. 529-34, Nov 1987.

Capítulo II

Anexos

10. ANEXOS

10.1. ARTIGOS RELACIONADOS À TESE DE DOUTORADO

10.1.1. Artigo publicado como primeira autora sobre a caracterização dos biofilmes de dermatófitos

Biofouling, 2014
<http://dx.doi.org/10.1080/08927014.2014.919282>



In vitro characterization of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* biofilms

C.B. Costa-Orlandi*, J.C.O. Sardi, C.T. Santos, A.M. Fusco-Almeida and M.J.S. Mendes-Giannini*

Department of Clinical Analysis, Clinical Mycology Laboratory, School of Pharmaceutical Sciences, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP 14801-902, Brazil

(Received 18 February 2014; accepted 22 April 2014)

Dermatophytes are fungi responsible for a disease known as dermatophytosis. Biofilms are sessile microbial communities surrounded by extracellular polymeric substances (EPS) with increased resistance to antimicrobial agents and host defenses. This paper describes, for the first time, the characteristics of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* biofilms. Biofilm formation was analyzed by light microscopy, scanning electron microscopy (SEM) and confocal laser scanning microscopy (CLSM) as well as by staining with crystal violet and safranin. Metabolic activity was determined using the XTT reduction assay. Both species were able to form mature biofilms in 72 h. *T. rubrum* biofilm produced more biomass and EPS and was denser than *T. mentagrophytes* biofilm. The SEM results demonstrated a coordinated network of hyphae in all directions, embedded within EPS in some areas. Research and characterization of biofilms formed by dermatophytes may contribute to the search of new drugs for the treatment of these mycoses and might inform future revisions with respect to the dose and duration of treatment of currently available antifungals.

Keywords: *Trichophyton rubrum*; *T. mentagrophytes*; biofilm; dermatophytes; SEM; CLSM

Introduction

Dermatophytes are fungi that have the ability to invade keratinized structures of humans and animals, producing a condition called dermatophytosis (Weitzman & Summerbell 1995). There are three anamorphic genera: *Trichophyton*, *Microsporium* and *Epidermophyton*, which share certain microscopic features despite the taxonomic distance between them (Weitzman & Summerbell 1995; Moraes et al. 2001; Costa-Orlandi et al. 2012).

Soil is a natural reservoir of dermatophytes; keratins present in soil are used as nutrients, so these fungi are adapted to various environments. Keratin is a protein of high molecular weight, relatively insoluble and present in the skin, hair, nails and debris deposited in soil (Saenz 2001; Aquino et al. 2007; Macura et al. 2010; Achterman & White 2012). The prevalence of dermatophytes is variable but high in Latin America, causing infections in both humans and domestic animals (Pineiro et al. 1997). The infection occurs when arthroconidia adhere to host skin, followed by germination and the invasion of keratinized structures by fungal hyphae. During invasion, keratinized tissues are digested by secretion of multiple endoproteases, the presence of which can determine fungal survival on the host as well as the clinical evolution of the infection, by providing nutrients, and triggering and modulating the immune response (Vermout et al. 2008; Baldo et al. 2012). The severity of the infection is related, in part, to the reaction of the host to the invading organism, in addition to other

factors, such as species or virulence of the infecting strain, host reaction to metabolic products produced by the fungus, anatomic site of infection, and local environmental factors (Soares et al. 2013). Endoproteases fall into two large protein families: the subtilisins (which are serine proteases) and the fungalysins (metalloproteases) (Monod 2008). Studies have demonstrated seven putative genes encoding serine proteases belonging to the subtilisin family (SUB) and five putative genes encoding metalloproteases belonging to the M36 family, which only exists in fungi (Zhang et al. 2013). The sequencing of seven dermatophyte genomes has recently been completed, and the sequences have been made publicly available. Seven genomes were found to encode high numbers of protease-encoding genes compared to related non-dermatophytic fungi. In particular, dermatophytes appear to have expanded sets of endopeptidases, exopeptidases, and secreted proteases (Achterman & White 2012).

This observation highlights the important role of protein degradation in the life cycle of dermatophytes (Achterman & White 2012). Many authors have investigated the virulence factors that are activated in dermatophytes exposed to environmental stresses such as growth on lipids (Peres et al. 2010; Maranhao et al. 2011), changes in pH (Silveira et al. 2010), and antifungal drugs (Peres et al. 2010).

Biofilms are structured sessile microbial communities that are organized by microorganisms adhering to a

*Corresponding authors. Email: carolbarceloscosta@gmail.com (C.B. Costa-Orlandi); giannini@fcfar.unesp.br (M.J.S. Mendes-Giannini)

10.1.2. Artigo publicado como co-autora, com resultados de citotoxicidade das células NHOK do doutorado.

Hindawi Publishing Corporation
Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine
Volume 2014, Article ID 957860, 9 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/957860>



Research Article

Anti-*Trichophyton* Activity of Protocatechuates and Their Synergism with Fluconazole

Luciana Arantes Soares,¹ Fernanda Patricia Gullo,¹ Janaina de Cássia Orlandi Sardi,¹ Nayla de Souza Pitangui,¹ Caroline Barcelos Costa-Orlandi,¹ Fernanda Sangalli-Lette,¹ Lilliana Scorzoni,¹ Luis Octávio Regasini,² Malcon Segalla Petrônio,² Patricia Fernanda Souza,² Dulce Helena Siqueira Silva,² Maria José Soares Mendes-Giannini,¹ and Ana Marisa Fusco-Almeida^{1,3}

¹ Laboratory of Clinical Mycology, Department of Clinical Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences, UNESP, Rodovia Araraquara-Jaú, Km 1, 14801-902 Araraquara, SP, Brazil

² Institute of Chemistry, UNESP, Rua Professor Francisco Degrati 55, 14800-900 Araraquara, SP, Brazil

³ Department of Clinical Mycology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rodovia Araraquara-Jaú, Km 1, 14801-902 Araraquara, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to Ana Marisa Fusco-Almeida; ana.marisa@qaol.com.br

Received 17 February 2014; Revised 23 May 2014; Accepted 1 June 2014; Published 18 June 2014

Academic Editor: Mohd Roslan Sulaiman

Copyright © 2014 Luciana Arantes Soares et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Dermatophytosis and superficial mycosis are a major global public health problem that affects 20–25% of the world's population. The increase in fungal resistance to the commercially available antifungal agents, in conjunction with the limited spectrum of action of such drugs, emphasizes the need to develop new antifungal agents. Natural products are attractive prototypes for antifungal agents due to their broad spectrum of biological activities. This study aimed to verify the antifungal activity of protocatechuic acid, 3,4-diacetoxycinnamic, and fourteen alkyl protocatechuates (3,4-dihydroxybenzoates) against *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* and to further assess their activities when combined with fluconazole. Susceptibility and synergism assays were conducted as described in M38-A2 (CLSI), with modifications. Three strains of *Trichophyton rubrum* and three strains of *Trichophyton mentagrophytes* were used in this work. The pentyl, hexyl, heptyl, octyl, nonyl, and decyl protocatechuates showed great fungicidal effects, with minimum inhibitory concentration (MIC) values ranging from 0.97 to 28 mg/L. Heptyl showed a synergistic activity (FIC index = 0.49), reducing the MIC of fluconazole by fourfold. All substances tested were safe, especially the hexyl, heptyl, octyl, and nonyl compounds, all of which showed a high selectivity index, particularly in combination with fluconazole. These ester associations with fluconazole may represent a promising source of prototypes in the search for anti-*Trichophyton* therapeutic agents.

1. Introduction

Superficial fungal infections are a major global public health problem that affects 20–25% of the population worldwide [1]. Among these diseases, dermatophytosis, or tinea, is one of the most frequent fungal infections. This infection is caused by dermatophyte species that belong to the *Trichophyton*, *Microsporum*, or *Epidermophyton* genera [2]. These dermatophytes commonly invade different keratinophilic regions of the body, causing tinea corporis, tinea cruris, tinea pedis,

tinea manus, tinea capitis, tinea barbae, and tinea unguium [3]. Dermatophyte infections can lead to either mild or severe symptoms, depending on the immunological response of the host [4]. Several patient groups also seem to be especially at risk of infection, including individuals with uncontrolled diabetes, AIDS, renal diseases, psoriasis, and types of immunosuppression, such as transplant recipients and patients on long-term corticosteroid therapy [5].

There is an urgent need to find new sources of substances with antidermatophytic activity because the treatment of

10.1.3. Artigo em fase final de escrita, sobre a resistência dos biofilmes aos antifúngicos convencionais e a atividade anti-biofilme potente do protococatecuato de nonila.

Antifungal resistance of *T. rubrum* and *T. mentagrophytes* biofilms to conventional antifungal drugs and nonyl protococatechuate (3,4 dihydroxybenzoate) as a promising anti-dermatophyte biofilm compound

Caroline Barcelos Costa-Orlandi^{1*}; Regina Helena Pires¹; Haroldo Cesar de Oliveira¹; Patrícia Akemi Assato¹; Mariana Bastos dos Santos²; Carlos Roberto Polaquini²; Luis Octavio Regasini²; Maria Aparecida de Resende-Stoianoff²; Ana Marisa Fusco-Almeida¹; Maria José Soares Mendes Giannini^{1**}

¹Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Araraquara, SP, Brazil 14801-902.

²Departamento de Química e Ciências Ambientais, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brazil

³Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil

Corresponding authors: Tel: +55-16-3301-4641 Fax: +55-16-3301-5717 E-mails: *carolbarceloscosta@gmail.com; **gianninimj@fctar.unesp.br

Abstract

Biofilms are sessile microbial communities surrounded by an extracellular matrix with an increased resistance to antimicrobial agents and host defense. The ability of dermatophytes in biofilm formation was recently described by our group. In this work, the susceptibilities of *T. rubrum* and *T. mentagrophytes* biofilms and planktonic cells to three antifungal drugs and to nonyl-3,4 dihydroxybenzoate (an derivative of protocatechuic acid) were determined for the first time. The pre-formed biofilms and planktonic cells of *T. rubrum* and *T. mentagrophytes* were treated with different concentrations of fluconazole, griseofulvin, terbinafine and nonyl-3,4 dihydroxybenzoate. The metabolic activities were determined using the XTT reduction assay. Finally, scanning electron microscopy (SEM) and confocal scanning laser microscopy were used to examine the effects of the treatments on biofilms structures. Fluconazole, griseofulvin, terbinafine and nonyl-3,4 dihydroxybenzoate were able to prevent the biofilm formation in all reference strains and clinical isolates tested ($p < 0.05$). *T. rubrum* and *T.*

mentagrophytes biofilms were significantly more resistant to fluconazole, griseofulvin and terbinafine than planktonic cells ($p < 0.05$). In contrast, both biofilms and planktonic cells were susceptible to nonyl-3,4 dihydroxybenzoate ($p > 0.05$). SEM results revealed that the antifungal drugs caused minor or no damage to the structure of the biofilms and, in some cases, stimulated the development of resistance structures. In contrast, the biofilms treated with nonyl-3,4 dihydroxybenzoate were seriously damaged. Confocal microscopy suggested that most of biofilms treated with nonyl and terbinafine has reduced thickness when compared to untreated biofilms. These findings show nonyl-3,4 dihydroxybenzoate as a promising anti-dermatophyte biofilm compound and can contribute significantly to the research of new drugs for the treatment of dermatophytosis.

Keywords: biofilms, dermatophytes, nonyl-3,4 dihydroxybenzoate, anti-biofilm activity, resistance

10.1.4. Artigo em fase inicial de escrita, sobre a resistência dos biofilmes aos antifúngicos convencionais e a atividade anti-biofilme potente do protocatecuato de nonila.

The Influence of Culture Media on Biofilm Formation by *T. rubrum* and *T. mentagrophytes*

C. B. Costa-Orlandi^{1*}, R. H. Pires¹, J.D. Nosanchuk², A. M. Fusco-Almeida¹, M. J. S. Mendes-Giannini^{1**}

¹Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Araraquara, SP, Brazil 14801-902

²Department of Medicine, Division of Infectious Diseases, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY, USA

Corresponding authors: Tel: +55-16-3301-4641 Fax: +55-16-3301-5717 E-mails: *carolbarceloscosta@gmail.com; **gianninimj@fcfar.unesp.br

Abstract

Over the last few years, filamentous fungi, particularly the dermatophytes, have been recognized as biofilm-forming microorganisms. Nutrients in the environment can influence the development and final chemical composition of biofilms, suggesting the correlation between metabolic substrates and biofilm architecture. This work aims to evaluate the influence of four different culture mediums on biofilm formation by *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes*. The biofilms of two ATCC strains and two clinical isolates of *T. rubrum* and *T. mentagrophytes* were observed following cultivation in RPMI 1640, Brain-heart infusion (BHI), Dulbecco's Modified Eagle's media (DMEM) and serum free medium for keratinocytes culture. After 72 hours of growth, the biomass and the extracellular matrix (ECM) were quantified using the crystal violet (CV) and safranin methods, respectively. The ultrastructures of the mature biofilms were visualized by scanning electron microscopy (SEM) and confocal laser scanning microscopy (CLSM). Overall, cultivation in RPMI, DMEM and BHI resulted in the most robust production of biomass and ECM. The biofilms of *T. rubrum* ATCC 28189, *T. rubrum* 143 and *T. mentagrophytes* 66 produced higher amounts of ECM compared to *T. mentagrophytes* ATCC 11481 (p<0.05). SEM images showed that the biofilms formed in RPMI, BHI and DMEM exhibited a highly organized ECM, covering and connecting the hyphae. CLSM images showed that RPMI and DMEM produced thicker biofilms, while the

BHI produced denser biofilms. These results demonstrate that *T. rubrum* and *T. mentagrophytes* are able to form biofilms in diverse culture mediums with varying characteristics and these variations can contribute significantly to future studies of dermatophyte biofilms.

Keywords: biofilms, culture medium, dermatophyte

10.2. ARTIGOS NÃO RELACIONADOS À TESE DE DOUTORADO

10.2.1. Artigo publicado como co-autora, verificando a atividade de derivados do ácido gálico contra dermatófitos.

Hindawi Publishing Corporation
Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine
Volume 2014, Article ID 506273, 8 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/506273>



Research Article

Antifungal Activity of Decyl Gallate against Several Species of Pathogenic Fungi

Ana Carolina Alves de Paula e Silva,¹ Caroline Barcelos Costa-Orlandi,¹
Fernanda Patricia Gullo,¹ Fernanda Sangalli-Lette,¹ Haroldo Cesar de Olivetra,¹
Julhiany de Fátima da Silva,¹ Lilitiana Scorzoni,¹ Nayla de Souza Pitangui,¹
Suélen Andrea Rossi,¹ Tatiane Benaducci,¹ Vanessa Gonçalves Wolf,¹
Luís Octávio Regasini,² Malcon Segalla Petrónio,²
Dulce Helena Siqueira Silva,² Vanderlan S. Bolzani,²
Ana Marisa Fusco-Almeida,¹ and Maria José Soares Mendes-Giannini¹

¹ Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacéuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho (UNESP), Rodovia Araraquara-Jatá, km 1, 14 800 901 Araraquara, SP, Brazil

² Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho (UNESP), Rua Professor Francisco Degen, 55, Bairro Quitandinha, 14800-060 Araraquara, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to Ana Carolina Alves de Paula e Silva; ana_alpasig@hotmail.com and Maria José Soares Mendes-Giannini; gianninimj@gmail.com

Received 11 June 2014; Revised 13 October 2014; Accepted 28 October 2014; Published 20 November 2014

Academic Editor: José L. Rios

Copyright © 2014 Ana Carolina Alves de Paula e Silva et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

This work aims to demonstrate that the gallic acid structure modification to the decyl gallate (GI4) compound contributed to increase the antifungal activity against several species of pathogenic fungi, mainly, *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Paracoccidioides* spp., and *Histoplasma capsulatum*, according to standardized microdilution method described by Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) documents. Moreover this compound has a particularly good selectivity index value, which makes it an excellent candidate for broad-spectrum antifungal prototype and encourages the continuation of subsequent studies for the discovery of its mechanism of action.

1. Introduction

In the last two decades, there has been a rapid increase in the incidence of invasive fungal infections (IFIs) caused by fungal pathogens with diminished susceptibility or resistance to many standard antifungal agents. The early treatment of IFIs is essential for optimal clinical outcomes. The effectiveness of standard antifungal drugs (polyenes, azoles, and echinocandins) is not predictable against some emerging fungi and may cause undesirable side effects. Furthermore, the use of antifungals is often inappropriate, exposing patients to adverse effects, drug interactions, and the development of resistance to and super infections by other fungi, reducing

their effectiveness and resulting in significant health expenditures. All of these factors are particularly problematic for immunocompromised (IC) or hospitalized patients with serious underlying diseases [1–5]. Considering that the diagnosis of these diseases remains challenging and that treatment is suboptimal, it is difficult to identify and implement the correct therapies.

The use of modified substances from natural compounds as prototypes of molecules for the treatment of diseases has increased abundantly in recent years. However, many of these products have no proven efficacy and safety. The aim of this study was adding new results about the antifungal activity *in vitro* of 14 alkyl gallates against important pathogenic

10.2.2. Revisão publicada sobre os métodos utilizados *in vitro* e *in vivo* para a avaliação de compostos de origem natural.

Journal of Microbiological Methods 123 (2016) 68–78



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmicmeth



Review

Searching new antifungals: The use of *in vitro* and *in vivo* methods for evaluation of natural compounds



Liliana Scorzoni*, Fernanda Sangalli-Leite, Junya de Lacorte Singulani, Ana Carolina Alves de Paula e Silva, Caroline Barcelos Costa-Orlandi, Ana Marisa Fusco-Almeida, Maria José Soares Mendes-Giannini*

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus Araraquara, Departamento de Análises Clínicas, Núcleo de Proteômica, Laboratório de Micologia Clínica, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 November 2015
Received in revised form 29 January 2016
Accepted 3 February 2016
Available online 4 February 2016

Keywords:

Fungi
Natural compounds
Antifungal activity
Efficacy
Methods

ABSTRACT

In the last decades, the increased number of immunocompromised patients has led to the emergence of many forms of fungal infections. Furthermore, there are a restricted arsenal of antifungals available and an increase in the development of resistance to antifungal drugs. Because of these disadvantages, the search for new antifungal agents in natural sources has increased. The development of these new antifungal drugs involves various steps and methodologies. The evaluation of the *in vitro* antifungal activity and cytotoxicity are the first steps in the screening. There is also the possibility of antifungal combinations to improve the therapy and reduce toxicity. Despite that, the application of the new antifungal candidate could be used in association with photodynamic therapy or using nanotechnology as an ally. *In vivo* tests can be performed to evaluate the efficacy and toxicity using conventional and alternative animal models. In this work, we review the methods available for the evaluation of the antifungal activity and safety of natural products, as well as the recent advances of new technology in the application of natural products for antifungal therapy.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	69
2. <i>In vitro</i> Methods	69
2.1. AGAR diffusion	69
2.2. Macrodilution and microdilution assay	70
2.3. Minimum fungicidal concentration assay	70
2.4. Colorimetric assays	70
2.5. Cytotoxicity assay	70
2.6. Combination of substances	71
3. <i>In vivo</i> models	71
3.1. Toxicology	71
3.2. Pharmacokinetics	71
3.3. Alternative animal models	72
3.4. Efficacy in mammalian model	72
4. New strategies to enhance the efficacies of antifungals	73
4.1. Photodynamic therapy (pdt) using natural compounds	73
4.2. The development of antifungal natural products using nanoparticle technology	73
4.3. Combination of PDT and nanoparticles of natural compounds against antifungal infection	74
5. Conclusion	75
Acknowledgments	75
References	75

* Corresponding authors at: Laboratório de Micologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, Brazil, Rodovia Araraquara - Jaiú Km 1, 14801-902.
E-mail addresses: liliscorzoni@yahoo.com.br (L. Scorzoni), giannini@fcar.unesp.br (M.J.S. Mendes-Giannini).

10.3. PREMIAÇÃO

Prêmio recebido pela *American Society for Microbiology* (ASM) e pela *Medical Mycology Society of Americas* (MMSA). *Carlyn Halde Latin American Student Travel Award*: melhor resumo entre a América Latina, Porto Rico e Caribe na área de micologia médica – 114th ASM *General Meeting* – Boston, MA, Estados Unidos, maio de 2014.

