

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Tese** será disponibilizado somente a partir de 23/02/2024.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS
À FARMÁCIA



TESE DE DOUTORADO

Avaliação do efeito da 2-chalcona mediada pela terapia fotodinâmica nos biofilmes mono e dual-espécies de *Candida* spp. e dermatófitos e mecanismos de interação desses microrganismos no biofilme misto

NÍURA MADALENA BILA

Orientadora: Prof.^a Dra. Maria José Soares Mendes Giannini

Coorientadores: Dra. Caroline Barcelos Costa Orlandi

Prof. Dr. Luis R. Martinez

Araraquara, SP

2022

NÍURA MADALENA BILA

Avaliação do efeito da 2-chalcona mediada pela terapia fotodinâmica nos biofilmes mono e dual-espécies de *Candida* spp e dermatófitos e mecanismos de interação dos microrganismos no biofilme misto

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologias 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 Doutora

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini

Coorientadora: Dra. Caroline Barcelos Costa Orlandi

Prof. Dr. Luis R. Martinez

Araraquara, SP

2022

-
- B595a** Bila, Níura Madalena.
Avaliação do efeito da 2-chalcona mediada pela terapia fotodinâmica nos biofilmes mono e dual-espécies de *Candida* spp. e dermatófitos e mecanismos de interação desses microrganismos no biofilme misto / Níura Madalena Bila. – Araraquara: [S.n.], 2022.
152 f. : il.
- Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.
- Orientadora: Maria José Soares Mendes Giannini.
Coorientadora: Caroline Barcelos Costa Orlandi.
Coorientador: Luis R. Martinez.
1. Dermatomicoses. 2. Biofilme. 3. Dermatófitos. 4. *Candida* sp. 5. 2-chalcona. 6. Atividade antibiofilme. 7. Terapia fotodinâmica. 8. Mecanismo de ação. I. Giannini, Maria José Soares Mendes, orient. II. Costa-Orlandi, Caroline Barcelos, coorient. III. Martinez, Luiz R., coorient. IV. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Avaliação do efeito da 2-chalcona mediada pela terapia fotodinâmica nos biofilmes mono e dual-espécies de *Candida* spp e dermatófitos e, interação dos microrganismos no biofilme misto

AUTORA: NÍURA MADALENA BILA

ORIENTADORA: MARIA JOSÉ SOARES MENDES GIANNINI

COORIENTADOR: LUIS R MARTINEZ

COORIENTADORA: CAROLINE BARCELOS COSTA ORLANDI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARIA JOSÉ SOARES MENDES GIANNINI (Participação Virtual)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP Araraquara

Profa. Dra. MARIA DA GLÓRIA SOUSA STAFOCKER (Participação Virtual)
Departamento de Dermatologia / Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da USP

Prof. Dra. JULIANA CAMPOS JUNQUEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal / Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos/UNESP

Prof. Dr. CRISTIANO GALLINA MOREIRA (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP

Araraquara, 23 de fevereiro de 2022

"Escolhe um trabalho que goste, e não terás que trabalhar nem um dia na tua vida."

Confúcio

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Salvador e Celeste, meus irmãos Adérito, Nuno e Dany, que não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida e, a minha sobrinha Marlene (In memoriam), que tão cedo se foi, mas sei que ela está torcendo por todos nós.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, autor do meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia, meu protetor em toda minha vida.

Ao Instituto de bolsas de estudo de Moçambique (IBE) junto com o Ministério de Ciências e Tecnologia, Ensino Superior e Técnico Profissional e ao Banco Mundial por me concederem a bolsa de estudos nos primeiros 20 meses do meu doutorado, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pela concessão de bolsa por aproximados 3 anos. Estas instituições tornaram possível a minha formação e realização da tese de doutorado.

A professora Maria José, por ter aceite ser minha orientadora, pelos ensinamentos, paciência ao longo das supervisões, o seu rigor e competência faz com que cada orientando seu se espelhe em você e queira adquirir suas capacidades e competências (nem que seja uma parte delas), para construção de um profissional melhor.

A minha coorientadora Dra. Caroline Barcelos, por ter me ensinado com muita paciência e perseverança como trabalhar em um laboratório, por ser presente e participativa em toda minha formação e nos experimentos, por me apoiar nos momentos que os experimentos davam errado e pelos conselhos. Com você aprendi algo muito importante "todo o detalhe faz total diferença".

A professora Ana Marisa por me receber de braços abertos, por ter cedido as chalconas para que eu pudesse desenvolver o meu trabalho e por sempre estar à disposição para ajudar e sempre me incluir nos seus projetos e parcerias. Foi muito importante para o meu aprendizado.

Ao meu coorientador Professor Luis R. Martinez pelas orientações, e não medir esforços para me receber em seu laboratório nos Estados Unidos, pena que a situação pandêmica mundial de COVID-19 não permitiu que fosse possível.

A equipe do laboratório de proteômica, Carol B., Carol V., Larissa, Marcos, Jenyffie, Samanta, William, Lariane, Panta, Nathália, Natália, Jaque, Priscila, Laranja, Mariana, Marina, Cláudia, Paulo, Angélica, Letícia, Jean, Kelvin, Fanciny, Kaila, Haroldo e Junya pelos momentos de convivência e aprendizados durante todo esse tempo.

A Rosângela (minha mãe preta do Brasil) pela ajuda com o fungo, por ter cedido o laboratório de micologia, pela amizade, convívio, risadas e pelos sábios conselhos que nos dava. A nossa vizinha de laboratório, Marisa (Marisinha) pelos cafés divertidos, conversas, risadas e pelo apoio.

As minhas amigas do laboratório Carol Vaso (transparente), Carol Barcelos (mamis), Larissa (pouca sombra) pelo vosso apoio incondicional, pela vossa presença nos momentos tristes e felizes, pelas loucuras, risadas e pronta ajuda. Vocês são as irmãs que a vida me deu e me mostraram que os laços de amizade são bem fortes quanto os de sangue.

A Carol Vaso e sua família que sempre me acolheram, e me “adotaram” como filha principalmente nesse período de pandemia.

A minha família, pai (Salvador) mãe (Celeste) e irmãos (Adérito, Nuno e Dany) por apostarem e acreditarem em mim, pelo cuidado, dedicação, presença nas horas que a saudade apertava e me sentia sozinha, e pelo incentivo de seguir sempre em frente, hoje tenho certeza de que não estou sozinha nessa caminhada.

A minha amiga Emelda que desde 2009 travamos juntas essa batalha árdua, que é vida acadêmica, por me apoiar em tudo e todos os momentos, pela amizade incondicional. Você sempre foi uma luz que ilumina o meu caminho.

Aos Colegas da Faculdade de Veterinária especialmente aos companheiros da secção de farmacologia e toxicologia, Faculdade de Veterinária-Universidade Eduardo Mondlane, Prof. Cristiano, Dra. Dácia e Prof. Bettencourt, pelo incentivo e força e por me ajudar a desbravar este mundo científico.

Aos meus colegas Tseu, Júlio, Atanásio, Regina, Charmila, Ivânia pelas conversas, companhia e incentivo.

Ao meu amigo João (Jinho) pela força, pelas conversas e por me ajudar, mesmo à distância, sempre que necessários nos problemas de informática e, ao Cristiano (Cris) pelas conversas, pelo apoio, conselhos e risadas.

E a todos que de forma direta ou indireta me ajudaram a alcançar esse sonho que tanto almejava, desde o meu processo de vinda ao Brasil, a minha estadia e os meus estudos.

RESUMO

As dermatomicoses são causadas por uma variedade de fungos, sendo os dermatófitos e as leveduras os de maior prevalência, na forma isolada ou associada. Os fungos dermatófitos e as espécies de *Candida* são capazes de formar biofilmes, que são associados ao aumento da virulência, da resistência aos fármacos e, conseqüentemente, da persistência da infecção. Assim, há necessidade de estudos de biofilmes com estes fungos e ampliação do arsenal terapêutico. O estudo pretendeu aprofundar o conhecimento sobre os biofilmes mono e dual espécies de *Candida* e dermatófitos e avaliação da ação antifúngica da 2-hidroxichalcona (2-chalcona), sua toxicidade e mecanismo de ação. Para tal, foi estudada a formação de biofilmes de *Microsporum canis*, e a capacidade antibiofilme da 2-chalcona no escuro e mediada por terapia fotodinâmica (PDT), a sua toxicidade *in vitro* em modelo de monocamada celular (2D) e em modelo tridimensional (3D) em linhagens de queratinócitos de pele humana (HaCat) e fibroblasto dérmico humano (HDFa) e, *in vivo* em larvas de *Caenorhabditis elegans* e *Galleria mellonella*. Além disso, foram estudados os fatores que promovem a inibição na interação dos dermatófitos e *C. albicans*/*C. parapsilosis* nos biofilmes. Os biofilmes de *M. canis* foram caracterizados por meio de quantificação da atividade metabólica, biomassa, estruturas polissacarídicas e matriz extracelular em RPMI 1640, caldo BHI, DMEM e HAM-F12. Os testes de sensibilidade foram conduzidos em isolado clínico de *M. canis* e cepas de referência de *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *C. albicans* e *C. parapsilosis* frente à 2-chalcona e aos antifúngicos convencionais. A 2-chalcona (no escuro e mediada pela PDT) e antifúngicos convencionais foram avaliados quanto à capacidade de inibir as células planctônicas (10^6 cel/ml) e os biofilmes, mono e dual-espécies, no estágio inicial e maduro. Os danos causados pela 2-chalcona nos biofilmes foram documentados por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal (MC). Foram quantificados os esteróis da membrana, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), os danos causados na parede celular e mecanismo de morte em células tratadas com 2-chalcona no escuro e fotoexcitada. Foi também avaliada o efeito do sobrenadante livre de células dos biofilmes de *T. rubrum*, *C. albicans* ou de *C. parapsilosis* quanto a capacidade de inibir os biofilmes e a filamentação de *C. albicans* por meio de redução de XTT, MEV e MC. *M. canis* foi capaz de formar biofilmes robustos em 96 horas de incubação nos meios BHI, DMEM e HAM-F12 e em menor escala no meio RPMI-1640. A 2-chalcona inibiu os biofilmes no estágio inicial e maduros de dermatófitos em concentrações superiores ou igual a 31,25 mg/L. Quando a 2-chalcona foi mediada pela PDT, houve redução das concentrações de inibição nas células planctônicas e nos biofilmes em quatro vezes quando comparada com a 2-chalcona no escuro. Os resultados de imagem por MEV e MC mostraram um total colapso das células com expressiva redução da espessura dos biofilmes. Já nos biofilmes de *Candida* e biofilmes dual-espécies, a 2-chalcona mostrou-se menos potente, embora a fotoexcitação tenha reduzido a sua concentração inibitória mínima. Os biofilmes de dermatófitos foram resistentes ao fluconazol e à terbinafina, assim como nos biofilmes mono e dual espécies frente ao itraconazol, fluconazol e caspofungina. Toxicidade da 2-chalcona no escuro e fotoexcitada foi observada em concentrações acima de 125 mg/L nos modelos 2D e 3D de células e *C. elegans*. Em *G. mellonella*, a 2-chalcona não mostrou toxicidade até em concentrações de 200 mg/kg. O tratamento com a 2-chalcona causou deformidade na parede celular fúngica, redução de esteróis da membrana citoplasmática e promoveu a geração de ROS, resultando, por conseguinte, em morte celular por apoptose e necrose. Os sobrenadantes livres de célula não reduziram as atividades metabólicas dos biofilmes, no entanto,

houve redução de sua espessura. Verificou-se ainda que a inibição da filamentação de *C. albicans* nos biofilmes mistos de *T. rubrum* e *C. albicans* foi influenciada pela interação direta entre os microrganismos. Sendo assim, este estudo abre portas para desvendar a os mecanismos de interação entre microrganismos no biofilme misto e aponta a 2-chalcona mediada por PDT como uma alternativa terapêutica potente para o tratamento das dermatofitoses.

Palavras-chave: Dermatomicoses, biofilme, dermatófitos, *Candida* sp., 2-chalcona, atividade antibiofilme, terapia fotodinâmica, mecanismo de ação.

ABSTRACT

Various fungi may cause dermatomycoses, and dermatophytes and yeast are the most prevalent, either isolated or associated. Dermatophyte and *Candida* species can form biofilms associated with increased virulence, drug resistance, and, consequently, the persistence of infection. Therefore, it is necessary to intensify studies in biofilms and expand the therapeutic arsenal. The study aimed to deepen the mono and dual-species biofilms of *Candida* sp and dermatophytes, as well as a new antifungal agent, its toxicity, and mechanism of action. Therefore, the formation of *Microsporum canis* biofilms and other dermatophytes was studied. The antibiofilm capacity of 2-hydroxychalcone (2-chalcone) was evaluated in the dark and mediated by photodynamic therapy (PDT), as well as its *in vitro* toxicity in a cell monolayer model (2D), and a three-dimensional model (3D) using human skin keratinocyte (HaCat) and human dermal fibroblast (HDFa) lines, and *in vivo* in *Caenorhabditis elegans* and *Galleria mellonella* larvae. In addition, factors that promote inhibition of the interaction of dermatophytes and *C. albicans* and *C. parapsilosis* in biofilms were studied. *M. canis* biofilms were characterized by quantifying metabolic activity, biomass, polysaccharide structures, and extracellular matrix in RPMI 1640, BHI broth, DMEM, and HAM-F12. Susceptibility assays were carried out on clinical isolates of *M. canis* and reference strains of *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *C. albicans*, and *C. parapsilosis* against 2-chalcone and conventional antifungals. 2-chalcone (in the dark and mediated PDT) and commercial antifungals were evaluated for their ability to inhibit planktonic cells (10^6 cel/ml), mono and dual-species biofilms in the initial and mature stages. Membrane sterols, reactive oxygen species (ROS) production, cell wall damage, and death mechanism were verified in cells treated with 2-chalcone in the dark and photoexcited. The effect of cell-free supernatant from *T. rubrum*, *C. albicans* or *C. parapsilosis* biofilms was also evaluated on the ability to inhibit biofilms and *C. albicans* filamentation by reducing XTT, SEM, and CM. *M. canis* was able to form robust biofilms in 96 hours of incubation on BHI, DMEM, and HAM-F12 media than on RPMI-1640 media. 2-chalcone inhibited initial and mature dermatophyte biofilms at concentrations greater than or equal to 31.25 mg/L. 2-chalcone PDT-mediated reduced the inhibition concentrations in planktonic cells and biofilms by 4-fold compared to 2-chalcone in the dark. The SEM and MC images showed a total collapse of the cell walls with a significant thickness reduction of the biofilms. In *Candida* biofilms and dual-species biofilms, 2-chalcone was less potent, although photoexcitation reduced its minimum inhibitory concentration. Dermatophyte biofilms were resistant to fluconazole and terbinafine. The same was observed in mono and dual-species biofilms against itraconazole, fluconazole and caspofungin. The 2D and 3D models of cell lines and *C. elegans* showed the toxicity of the 2-chalcone in dark and photoexcited at concentrations above 125 mg/L. In *G. mellonella*, 2-chalcone did not show toxicity even at 200 mg/kg concentrations. Treatment with 2-chalcone caused deformity in the fungal cell wall, reduced membrane sterols, and promoted ROS

generation, resulting in cell death by apoptosis and necrosis. Cell-free supernatants did not reduce the metabolic activities of the biofilms; however, there was a reduction in the thickness of the biofilms. The direct interaction between the microorganisms influenced the filamentation inhibition of *C. albicans* in the mixed biofilms of *T. rubrum* and *C. albicans*. Therefore, this study opens doors to unravel the mechanisms of interaction between microorganisms in the mixed biofilm and points to PDT-mediated 2-chalcone as a potent therapeutic alternative for the treatment of dermatophytosis.

Keywords: Dermatomycosis, biofilm, dermatophytes, *Candida* sp, 2-chalcone, antibiofilm activity, photodynamic therapy, mechanism of action.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação esquemática do mecanismo da terapia fotodinâmica pelo diagrama de Jablonski, mostrando os principais eventos que levam a reações fotoquímicas do tipo I e do tipo II, que resultam em danos celulares oxidativos. PS- fotossensibilizador ; $^3\text{O}_2$ -oxigênio tripleto; $^1\text{O}_2$ -oxigênio singleto (FOOTE, 1991).33
- Figura 2:** Quantificação da atividade metabólica da formação dos biofilmes de *M. canis* por meio do ensaio de redução de XTT em função do tempo nos meios de cultura BHI, HAM-F12, DMEM e RPMI-1640.63
- Figura 3:** Comparação da atividade metabólica dos biofilmes com 96 horas de formação (96 h) de *M. canis*, obtida pelo método de XTT nos meios de cultura BHI, HAM-F12, DMEM e RPMI-1640 (resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).63
- Figura 4:** Cinética da formação da biomassa dos biofilmes de *M. canis* quantificada pelo método de cristal violeta nos meios de cultura BHI, HAM-F12, DMEM e RPMI-1640.....65
- Figura 5:** Comparação da biomassa dos biofilmes maduros de *M. canis*, obtida pelo método de cristal violeta formados nos meios de cultura BHI, HAM-F12, DMEM e RPMI-1640 (resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0,001$).66
- Figura 6:** Cinética da formação dos elementos da matriz extracelular dos biofilmes de *M. canis* quantificada pelo método de safranina em meios de cultura BHI, HAM-F12, DMEM e RPMI-1640.67
- Figura 7:** Cinética da formação dos elementos da matriz extracelular dos biofilmes de *M. canis* quantificada pelo método de safranina em meios de cultura BHI, HAM-F12, DMEM e RPMI-1640. (Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).68
- Figura 8:** Efeito da 2-chalcona, terbinafina e fluconazol nas células planctônicas na concentração de 10^6 cel/mL de *T. rubrum* ATCC 28189, *T. rubrum* ATCC MYA-4438, *T. mentagrophytes* ATCC 11481 e *M. canis* 39/18 mensurado pelo método de redução de XTT (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).77
- Figura 9:** Efeito da 2-chalcona, itraconazol, fluconazol e caspofungina nas células planctônicas na concentração de 10^6 cel/mL de *C. albicans* SC 5314 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 mensurado pelo método de redução de XTT (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).78
- Figura 10:** Efeito da 2-chalcona, terbinafina e fluconazol nos biofilmes em estágio inicial de *T. rubrum* ATCC 28189, *T. rubrum* ATCC MYA-4438, *T. mentagrophytes* ATCC 11481 e *M. canis* 39/18 mensurado pelo método de redução de XTT (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).80
- Figura 11:** Efeito da 2-chalcona, itraconazol, fluconazol e caspofungina nos biofilmes mono-espécie de *C. albicans* SC 5314 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 e dual espécies formados entre *T. rubrum* ATCC 28189 + *C. albicans* SC 5314 e *T. rubrum* ATCC 28189 + *C. parapsilosis* ATCC 22019 em estágio inicial, mensurado pelo método de redução de XTT(*** $p < 0,001$).81

Figura 12: Efeito da 2-chalcona, fluconazol e terbinafina nos biofilmes maduros de <i>T. rubrum</i> ATCC 28189, <i>T. rubrum</i> ATCC MYA-4438, <i>T. mentagrophytes</i> ATCC 11481 e <i>M. canis</i> 39/18 mensurado pelo método de redução de XTT (* p< 0,05; ** p<0,01; ***p<0,001).	83
Figura 13: Efeito da 2-chalcona, itraconazol, fluconazol e caspofungina nos biofilmes maduro mono-espécie de <i>C. albicans</i> SC 5314 e <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 e dual-espécies formados entre <i>T. rubrum</i> ATCC 28189 + <i>C. albicans</i> SC 5314 e <i>T. rubrum</i> ATCC 28189 + <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 mensurado pelo método de redução de XTT (* p< 0,05; ** p<0,01; ***p<0,001).	84
Figura 14: Efeito da 2-chalcona na terapia fotodinâmica em células planctônicas na concentração de 106 cel/mL (A), biofilme no estágio inicial (B) e maduro (C) de <i>T. rubrum</i> ATCC 28189, <i>T. mentagrophytes</i> ATCC 11481 e <i>T. rubrum</i> ATCC MYA-4438, mensurado pelo método de redução de XTT (* p< 0,05; ** p<0,01; ***p<0,001).	88
Figura 15: Efeito da 2-chalcona na terapia fotodinâmica em células planctônicas na concentração de 106 cel/mL (A), biofilme no estágio inicial (B) e maduro (C) de biofilmes nono espécie de <i>C. albicans</i> SC 5314 e <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 e dual espécies formados entre <i>T. rubrum</i> ATCC 28189 + <i>C. albicans</i> SC 5314 e <i>T. rubrum</i> ATCC 28189 + <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019, mensurado pelo método de redução de XTT (* p< 0,05; ** p<0,01; ***p<0,001).	89
Figura 16: Eletromicrografia de biofilme de <i>T. rubrum</i> ATCC 28189, tratado na fase inicial com 2-chalcona. As imagens A e B - indicam o controle (sem tratamento). C e D - representam os biofilmes após o tratamento com a 2- chalcona (15,6 mg/L).....	91
Figura 17: Eletromicrografia de biofilme de <i>T. rubrum</i> ATCC MYA-4438, tratado na fase inicial com 2-chalcona. As imagens A e B - indicam o controle (sem tratamento). C e D representam os biofilmes após o tratamento com a 2- chalcona (15,6 mg/L).	92
Figura 18: Eletromicrografia de biofilme de <i>T. mentagrophytes</i> ATCC 11481, tratado na fase inicial com 2-chalcona. As imagens A e B - indicam o controle (sem tratamento). C e D - representam os biofilmes após o tratamento com a 2- chalcona (15,6 mg/L)	92
Figura 19: Eletromicrografia de biofilme de <i>T. rubrum</i> ATCC 28189, tratado no estágio maduro com 2-chalcona. As imagens A e B - indicam o controle sem tratamento. C e D - representam os biofilmes após o tratamento com a 2- chalcona (31,25 mg/L).	93
Figura 20: Eletromicrografia de biofilme de <i>T. rubrum</i> ATCC MYA-4438, tratado no estágio maduro com 2-chalcona. As imagens A e B - indicam o controle sem tratamento. C e D - representam os biofilmes após o tratamento com a 2- chalcona (15,6 mg/L).	93
Figura 21: Eletromicrografia de biofilme de <i>T. mentagrophytes</i> ATCC 11481, tratado no estágio maduro com 2-chalcona. As imagens A e B - indicam o controle sem tratamento. C e D - representam os biofilmes após o tratamento com a 2- chalcona (15,6 mg/L).	94
Figura 22: Imagens de microscopia eletrônica de varredura das topografias dos biofilmes de <i>T. rubrum</i> ATCC MYA-4438 não tratados e formados no escuro (C e D) comparados aos biofilmes irradiados com a luz LED azul a 150 J.cm-2 (A e B) e 2-chalcona (7,8 mg/L) + LED azul a 150 J.cm-2 (E e F).	94

Figura 23: Imagens de microscopia eletrônica de varredura das topografias dos biofilmes de <i>T. rubrum</i> ATCC MYA-4438 formados em unhas humanas não tratados (A e B) e tratados com 2-chalcona fotossensibilizada (C e D).....	95
Figura 24: Imagens de microscopia de varredura a laser confocal de biofilmes maduros de <i>T. rubrum</i> ATCC 28189 formados em placas com fundo de vidro (A - F) e tratados com 2-chalcona (G, H) e corados com Concanavalin A–Alexa Fluor™ 488 (verde) e FUN 1 (vermelho). Representação do volume da distribuição espacial dos biofilmes (A, C, E e G) e vista frontal das seções Z reconstruídas dos biofilmes (B, D, F e H).	97
Figura 25: Imagens de microscopia de varredura a laser confocal de biofilmes maduros de <i>T. rubrum</i> ATCC 28189 formados em placas com fundo de vidro (A - F) e tratados com 2-chalcona mediada pela PDT (G, H) e corados com Concanavalin A–Alexa Fluor™ 488 (verde) e FUN 1 (vermelho). Representação do volume da distribuição espacial dos biofilmes (A, C, E e G) e vista frontal das seções Z reconstruídas dos biofilmes (B, D, F e H).....	98
Figura 26: Viabilidade das células HaCat pelo método de redução da resazurina, após colocadas em contato com 2-chalcona e exposta a luz azul na dose de 150 J/cm ² e, mantidas no escuro nos modelos monocamada (A) e esferóide (B). Os valores são expressos em microgramas por mililitro (µg/mL).....	100
Figura 27: Viabilidade das células HDFa pelo método de redução da resazurina, após colocadas em contato com 2-chalcona e exposta a luz azul na dose de 150 J/cm ² e, mantidas no escuro nos modelos: monocamada (A) e esferóide (B). Os valores são expressos em microgramas por mililitro (µg/mL).....	101
Figura 28: Porcentagem de sobrevivência de <i>Caenorhabditis elegans</i> no estágio larval 4 (L4) da cepa mutante AU37 (A) e tipo selvagem N2 (B) após 24 h de tratamento com diferentes concentrações de 2-chalcona e 2-chalcona mediada pela PDT (***p<0,001).....	106
Figura 29: Imagem representativa de larvas N2 de <i>C. elegans</i> no estágio larval L4 tratadas com diferentes concentrações de 2-chalcona: 250 mg/L (A); 125 mg/L (B); 62,5 mg/L (C); 31,25 mg/L (D); 15,6 mg/L (E); 7,8 mg/L (F); 3,9 mg/L (G); 1,95 mg/L (H); 0,98 mg/L (I) e controle sem tratamento (J) (magnificação 10X). As larvas em forma de bastão foram consideradas mortas, enquanto larvas sinusoidais foram consideradas vivas.....	107
Figura 30: Imagem representativa de larvas N2 de <i>C. elegans</i> no estágio larval L4 tratadas com diferentes concentrações de 2-chalcona mediada pela terapia fotodinâmica: 250 mg/L (A); 125 mg/L (B); 62,5 mg/L (C); 31,25 mg/L (D); 15,6 mg/L (E); 7,8 mg/L (F); 3,9 mg/L (G); 1,95 mg/L (H); 0,98 mg/L (I) e controle sem tratamento (J) (magnificação 10X). As larvas em forma de bastão foram consideradas mortas, enquanto larvas sinusoidais foram consideradas vivas.	108
Figura 31: Curva de sobrevivência de larvas de <i>G. mellonella</i> tratadas com diferentes concentrações de 2-chalcona (10, 50, 100 a 200 mg/kg).....	110
Figura 32: Quantidade de esteróis extraídos de <i>T. rubrum</i> ATCC 28189 não tratado e tratado com o 2-chalcona no escuro (7,8 mg/L), 2-chalcona fotossensibilizada (1 mg/mL), fluconazol (128 mg/L) e anfotericina B (1 mg/L). ** p <0,01; *** p <0,0001.....	113

- Figura 33:** Imagens de microscopia confocal de varredura a laser de *T. rubrum* ATCC 28189 sem tratamento (A), tratado com 7,8 mg/L 2-chalcona no escuro (B) e 128 mg/L de fluconazol (C). Em todas as imagens a parede celular apresenta-se corada com o calcoflúor white, entretanto as células tratadas com 2-chalcona mostraram alteração na estrutura da parede celular.114
- Figura 34:** Produção de ROS após tratamento de *T. rubrum* ATCC 28189 com 2-chalcona no escuro e mediada pela PDT (2-chalcona + LED). * P <0,001.116
- Figura 35:** Mecanismo de morte após tratamento de *T. rubrum* ATCC 28189 com 2-chalcona no escuro e com PDT mediada por 2-chalcona (2-chalcona + LED), por apoptose (A) e necrose (B) em comparação com o controle não tratado. * p <0,001.118
- Figura 36:** Microscopia eletrônica de transmissão de *T. rubrum* 28189 tratado com 2-chalcona no escuro, 2-chalcona fotoexcitada, anfotericina B e fluconazol. A e B mostram uma hifa sem tratamento em corte longitudinal. Com o tratamento, observou-se ausência dos vacúolos (C-J); desarranjo (setas pretas) e/ou rompimento da membrana plasmática (Setas vermelhas) e até mesmo desaparecimento de algumas organelas (C-J).120
- Figura 37:** Efeito dos sobrenadantes livres de células dos biofilmes de *C. albicans* SC 5314 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 nos biofilmes de *T. rubrum* ATCC 28189 e do sobrenadante de *T. rubrum* ATCC 28189 nos biofilmes de *C. albicans* SC 5314 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 mensurado pelo método de redução de XTT.....122
- Figura 38:** Imagens de microscopia eletrônica de varredura de biofilmes *C. albicans* SC 5314 tratados com sobrenadantes livres de células dos biofilmes *T. rubrum* ATCC 28189 (B) e, *T. rubrum* ATCC 28189 tratados com sobrenadante livre células de biofilmes de *C. albicans* SC 5314 (D). A e C representam biofilmes de *C. albicans* e *T. rubrum* sem tratamento respectivamente.....123
- Figura 39:** Imagens de varredura confocal de biofilmes *T. rubrum* ATCC 28189 tratados com sobrenadante livre células de biofilmes de *C. albicans* SC 5314 e corados com calcofluor White (B) e de biofilmes de *C. albicans* SC 5314 tratados com sobrenadantes livres de células dos biofilmes *T. rubrum* ATCC 28189 e corados com CFSE (B). A e C representam biofilmes de *C. albicans* e *T. rubrum* sem tratamento.123
- Figura 40:** Avaliação da filamentação de células de *C. albicans* em biofilmes mistos de *T. rubrum* ATCC 28189 + *C. albicans* SC 5314 formados de forma direta e indireta por sistema transwell. As células de *T. rubrum* foram coradas com Calcofluor White (A), as células de *C. albicans* foram coradas com CFSE (B). C: representa a sobreposição das colorações de ambos os microrganismos que constituem a comunidade mista (merge); D-representa a estrutura das células de *C. albicans* nos biofilmes indiretamente separados por transwell.....124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atividade antifúngica (expressa em mg/L) da 2- chalcona e fármacos comerciais frente a espécies de dermatófitos. **TRB** - terbinafina; **FCZ** – fluconazol; **CIM** – concentração inibitória mínima; **CFM** – concentração fungicida mínima.....71

Tabela 2: Atividade antifúngica (expressa em mg/L) da 2- chalcona e fármacos comerciais frente a espécies de *Candida*. **ICZ** - itraconazol; **FCZ** – fluconazol; **CIM** – concentração inibitória mínima; **CFM** – concentração fungicida mínima.71

Tabela 3: Valores de IC₅₀ e índice de seletividade (IS) em células HaCat (monocamada e esferoide) e HDFa (monocamada e esferoide de 2-chalcona e 2-chalcona usada como fotossensibilizador em células planctônicas (10⁶ cel/mL) e biofilmes maduros de *T. rubrum* ATCC 28189, *T. rubrum* ATCC MYA4438, *T. mentagrophytes* ATCC 1143 e *M. Canis* 39/19. Tr- *T. rubrum*; Tm- *T. mentagrophytes*;103

Tabela 4: Interação entre a 2-chalcona livre e os fármacos antifúngicos (terbinafina e fluconazol) contra cepas de *T. rubrum* ATCC 28189 e MYA-4438 e, *T. mentagrophytes* ATCC 11481111

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC – *American Type Culture Collection*

BHI – *Brain Heart Infusion*

CDC- *Centers for Disease and Control*

Cel- células

CFM – Concentração fungicida mínima

CIF - concentração inibitória fracionada

CIM – Concentração inibitória mínima

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CO₂ - Dióxido de carbono

Chalc - Chalcona

DMSO – Dimetilsulfóxido

DMEM – Dulbecco Modification of Minimum Essential Media

FCZ - fluconazol

GST - glutationa-S-transferase

HaCat - Queratinócitos de pele humana

Ham-F12 - F-12 Nutrient Mixture

h – horas

ICIF - índice de concentração inibitória fracionada

IC50 - Concentração onde ocorre 50% de morte celular

IL – Interleucina

INF- Interferon

IS - Índice de seletividade

KCl- cloreto de potássio

LED - Light Emitting Diode

L- Litros

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

mg – Miligramas

mL - Mililitros

mM – Milimolar

mV - milivolts

MOPS - Ácido 3-(N-morfolina) propanossulfônico

MRC-5 - Fibroblastos de pulmão

NaCl – Cloreto de sódio

nm – Nanômetros

NP – Nanopartícula

PBS – Tampão fosfato-salino

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PS - Fotossensibilizador

pH – Potencial de hidrogênio

ROS – Espécies reativas de oxigênio

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*

Rpm – rotação por minuto

SQLE – Esqualeno epoxidase

Tm – *T. mentagrophytes*

Tr – *Trichophyton rubrum*

TRB - terbinafina

UFC – Unidades formadoras de colônia

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

µg – Microgramas

µL – Microlitros

μm - micrômetros

3D - três dimensões

$^1\text{O}_2$ – Oxigênio singlete

$^3\text{O}_2$ – Oxigênio triplete

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Evolução taxonômica e revisão histórica dos dermatófitos e do gênero <i>Candida</i>	17
1.2. Epidemiologia	22
1.3. Patogenia	23
1.4. Tratamento	27
1.5. Alternativas terapêuticas	30
1.5.1. Chalconas	31
1.5.2. Terapia fotodinâmica.....	32
1.6. Modelos alternativos para estudo de toxicidade e eficácia antifúngica de novas moléculas	34
1.6.1. <i>Galleria mellonella</i>	35
1.6.2. <i>Caenorhabditis elegans</i>	36
1.6.3. Modelo tridimensional de linhagens celulares	36
JUSTIFICATIVA	37
2. OBJETIVOS	40
2.1. Objetivo geral:.....	40
2.2. Objetivos específicos:	40
3. METODOLOGIA	42
3.1. Microrganismos e obtenção da 2- chalcona	42
3.2. Ensaio de formação do biofilme de <i>M. canis</i>	42
3.2.1. Quantificação do biofilme	43
3.3. Avaliação da sensibilidade de dermatófitos e, <i>C. albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i> à 2-chalcona e antifúngicos pela técnica de microdiluição	44
3.3.1. Diluição da 2-chalcona	44
3.3.2. Diluição dos fármacos antifúngicos	45
3.3.3. Determinação da concentração inibitória mínima	46
3.3.4. Controle de qualidade	47
3.4. Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)	47
3.5. Atividade <i>in vitro</i> da combinação entre terbinafina, fluconazol e 2-chalcona contra <i>T. rubrum</i> e <i>T. mentagrophytes</i>	47
3.6. Efeito dos fármacos antifúngicos e da 2-chalcona nas células planctônicas (10 ⁶ cel/mL) de dermatófitos e de <i>C. albicans</i> / <i>C. parapsilosis</i>	48
3.7. Ensaio de sensibilidade dos biofilmes monoespécie em formação e maduros frente aos fármacos antifúngicos e 2-chalcona.	49
3.8. Ensaio de sensibilidade dos biofilmes dual espécie entre <i>C. albicans</i> e <i>T. rubrum</i> / <i>C. parapsilosis</i> e <i>T. rubrum</i> aos fármacos antifúngicos e 2-chalcona.	50

3.9. Ensaio de terapia fotodinâmica	50
3.10. Análise topográfica dos biofilmes por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	51
3.11. Avaliação da espessura e metabolismo dos biofilmes por microscopia de varredura a laser confocal	51
3.12. Citotoxicidade da 2-chalcona em queratinócitos de pele humana (HaCat) e Fibroblasto Dérmico Humano (HDFa).....	52
3.12.1. Teste em modelo monocamada	52
3.12.2. Teste em modelo tridimensional (3D)	53
3.13. Toxicidade <i>in vivo</i> da 2-chalcona no escuro e fotoexcitada.....	53
3.13.1. Modelo alternativo <i>C. elegans</i>	53
3.14. Determinação de mecanismo de ação	55
3.14.1. Análise de danos na parede celular.....	55
3.14.2. Quantificação de ergosterol da membrana	55
3.14.3. Ensaio de apoptose/necrose	56
3.14.4. Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS)	57
3.14.5. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	57
3.15. Avaliação da atividade antibiofilme do sobrenadante dos biofilmes de <i>C. albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i> contra biofilmes de <i>T. rubrum</i> e do sobrenadante de <i>T. rubrum</i> contra os biofilmes de <i>C. albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i>	58
3.16. Avaliação da filamentação da <i>C. albicans</i> nos biofilmes mistos de <i>T. rubrum</i> ATCC 28189 e <i>C. albicans</i> SC 5314 cultivados de forma direta e indiretamente separados	59
3.17. Forma de análise dos resultados.....	60
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1. Ensaio de formação de biofilme de <i>M. canis</i>	61
4.1.1 Determinação da atividade metabólica do biofilme pelo ensaio de redução de XTT	61
4.1.2. Quantificação da biomassa do biofilme pelo ensaio do cristal violeta.....	65
4.1.3. Quantificação da matriz extracelular pela coloração com Safranina	67
4.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM).....	69
4.3. Efeito dos fármacos antifúngicos e da 2-chalcona nas células planctônicas na concentração de 10 ⁶ cel/mL nas espécies de dermatófitos e <i>Candida</i> sp	74
4.4. Efeito dos fármacos antifúngicos 2-chalcona nos biofilmes em estágio inicial.....	79
4.5. Efeito dos fármacos antifúngicos e da 2-chalcona nos biofilmes maduros.....	82
4.6. Efeito da terapia fotodinâmica nas células planctônicas, biofilme inicial e maduro	85
4.7. Microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes tratados com 2-chalcona e 2-chalcona mediada pela PDT	90
4.8. Microscopia de varredura a laser confocal.....	95

4.9. Ensaio de citotoxicidade em monocamadas e em modelo tridimensional da 2-chalcona em fibroblasto dérmico humano (HDFa) e queratinócitos de pele humana (Hacat).....	100
4.10. Ensaio de toxicidade <i>in vivo</i>	104
4.11. Atividade <i>in vitro</i> da combinação entre terbinafina, fluconazol e 2-chalcona contra <i>T. rubrum</i> e <i>T. mentagrophytes</i>	110
4.12. Determinação de mecanismo de ação da 2-chalcona	112
4.13. Avaliação da atividade antibiofilme e inibição de filamentação de sobrenadante de biofilmes de <i>T. rubrum</i> contra biofilmes de <i>C. albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i> e atividade antibiofilme do sobrenadante de <i>C. albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i> contra os biofilmes de <i>T. rubrum</i>	121
5. CONCLUSÕES	126
Referências bibliográficas.....	128

1. INTRODUÇÃO

Infecções dérmicas fúngicas, denominadas dermatomicoses, estão entre as infecções mais frequentes em todo o mundo. São causadas principalmente por dermatófitos, espécies de leveduras dos gêneros *Candida* e bolores não dermatofíticos (GAWAZ; WEISEL, 2018; SEGAL; FRENKEL, 2015; SILVA-ROCHA; AZEVEDO; CHAVES, 2017).

1.1. Evolução taxonômica e revisão histórica dos dermatófitos e do gênero *Candida*

Dermatófito é uma designação comum dada para um grupo de fungos filamentosos com capacidade de infectar estruturas queratinizadas como pele, pelos e unhas de homens e animais causando uma doença denominada dermatofitose, também conhecida popularmente por “tinha” ou “tinea” (COSTA-ORLANDI et al., 2014; HEIDRICH et al., 2015; MARAKI; MAVROMANOLAKI, 2016).

De acordo com a sua predileção, estes fungos podem ser classificados como antropofílicos, zoofílicos e geofílicos. Os antropofílicos acometem principalmente o homem e raramente os animais (Ex: *Trichophyton rubrum* e *T. interdigitale*). Já os zoofílicos, infectam principalmente os animais e podem também infectar o homem (Ex: *T. mentagrophytes* e *Microsporum canis*). Por fim, os geofílicos são encontrados principalmente no solo, como *M. gypseum*, alimentando-se de queratina de pêlos, penas, cascos ou outra fonte inanimada, servindo, deste modo, como fonte de infecção para o homem e animais (IVASKIENE et al., 2016; MORIELLO, 2004). Esses fungos pertencem à família *Arthrodermataceae* e são descritos como um dos microrganismos mais antigos que causam doença em humanos (COSTA-ORLANDI et al., 2014; DE HOOG et al., 2017; HEIDRICH et al., 2015).

Os primeiros relatos de dermatófitos foram feitos entre os anos de 1840 e 1875. Foram descritas as espécies conhecidas hoje como *Microsporum audouinii*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton schoenleinii*, *T. tonsurans* e *T. mentagrophytes* (DE HOOG et al., 2017). Após Pasteur

descobrir a cultura axênica, dezesseis espécies associadas à humanos foram introduzidas entre 1870 e 1920 por Sabouraud, que baseou-se fortemente em sinais clínicos dos pacientes, bem como em estruturas fúngicas observadas em amostras clínicas (DE HOOG et al., 2017; EMMONS, 1934). Esse sistema de classificação, mostrou-se inconsistente no caso da classificação de fungos encontrados na natureza. Em 1934, realizou-se classificação das espécies de dermatófitos baseando-se nas características morfológicas das estruturas vegetativas e dos conídios, diferenciando claramente os gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. Os gêneros *Achorion* e *Endodermophyton* foram excluídos e suas espécies distribuídas entre gêneros reconhecidos. Até aquele momento, todas as espécies de dermatófitos foram consideradas fungos imperfeitos (DE HOOG et al., 2017; EMMONS, 1934).

A classificação morfológica foi viável como parâmetro de diagnóstico para isolados recentes pois, após algum tempo de cultivo, as colônias tornavam-se pleomórficas, nas quais as características não eram reproduzidas. Devido essa rápida degeneração das características morfológicas, foram introduzidas 118 espécies de dermatófitos que vieram de certa forma, confundir a denominação dermatofítica (DE HOOG et al., 2017; ZHAN; LIU, 2017). Em 1956, após investigações sobre a fisiologia e a resposta aos fatores de crescimento dos dermatófitos, pesquisadores do CDC (*Centers for Disease and Control*) tornaram mais claro o conceito “espécie”, facilitando a identificação e levando à redução do número de espécies e variedades desses fungos. No entanto, ainda existiam alguns pontos questionáveis em relação a identificação de variantes dentro de uma mesma espécie (SUDMAN, SCHMITT, 1965).

Em 1959 foram descobertas espécies teleomorfas (estado perfeito ou sexuado) de dermatófitos por Dawson e Gentles. Poucos anos depois, usando-se a técnica de isca de cabelo preconizada por Vanbreuseghem, foram descobertos muitos dermatófitos teleomorfos geofílicos e zoofílicos, assim como dermatófitos não patogênicos como *T. terrestre* e *T. ajelloii*, pertencentes aos gêneros *Arthroderma* ou *Nannizzia* (GRÄSER; SCOTT; SUMMERBELL, 2008; WEITZMAN;

SUMMERBELL, 1995). A descoberta dos estados sexuais justificou vários fatores para a compreensão da taxonomia como por exemplo, o pleomorfismo (EL-ANI, 1968), e a introdução de novos nomes, ainda que de nomenclatura dupla. Contudo, a nomenclatura tomou um novo rumo após a descoberta que muitos membros de diferentes espécies poderiam ser estimulados a revelar seu tipo de reprodução em uma reação de acasalamento incompleta com os testadores *Arthroderma simii* (EL-ANI, 1968).

Davison et al. (1980) introduziram a classificação taxonômica de espécies de dermatófitos estabelecidas com base na composição molecular do seu material genético. A partir daí, a classificação taxonômica das espécies dermatofíticas passou a ser mais plausível e clara (MOCHIZUKI et al., 1996). Muitos métodos moleculares foram aplicados para a identificação de espécies e taxonomia de dermatófitos, por exemplo, a amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD) (ZHONG et al., 1997), espaçador interno do transcrito (ITS) (GRÄSER et al., 1999a; MAKIMURA et al., 1999) PCR, polimorfismo amplificado de comprimento de fragmento (AFLP) (GRÄSER et al., 1999b), marcadores microssatélites (KASZUBIAK et al., 2004), polimorfismo de conformação de cadeia única (SSCP) (CAFARCHIA et al., 2009).

À luz do avanço tecnológico, as filogenias foram fortemente influenciadas pelas relações evolutivas das espécies de dermatófitos (KASZUBIAK et al., 2004). A revelação dessa relação próxima coincidiu com um colapso significativo no número de espécies reconhecidas. Por outro lado, algumas espécies tradicionalmente reconhecidas, permaneceram na mesma sinonímia mesmo após o exame de múltiplos genes. No geral, os fungos foram classificados em quatro gêneros: três anamorfos, nomeadamente, *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* e um teleomorfo denominado *Arthroderma* (GRUMBT; MONOD; STAIB, 2011).

Atualmente é usada a taxonomia proposta por De Hoog et.al (2017) que classifica a família *Arthrodermataceae* em nove gêneros, nomeadamente: *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Nannizzia*,

Paraphyton, *Microsporum*, *Lophophyton*, *Arthroderma*, *Ctenomyces* e *Guarromyces*. Entretanto, os principais gêneros continuam sendo *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. Dentro dessa classificação, recomenda-se que a denominação *T. interdigitale* seja aplicada somente em isolados antropofílicos e *T. mentagrophytes* para isolados zoofílicos, anteriormente denominados como *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* e *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* respectivamente. Mesmo assim, tem-se relatado equívocos taxonômicos como em Nenoff et al. (2018), que verificaram que o agente causador do surto de dermatofitose em humanos na Índia, apresenta um neótipo mais próximo do neótipo das cepas de *T. mentagrophytes* e não de cepas de *T. interdigitale*, embora segundo a nova taxonomia pertence à espécie *T. interdigitale*.

Clinicamente, as infecções por dermatófitos são classificadas pela denominação *tinea* seguido do local anatômico afetado, *tinea corporis* (corpo, em especial tronco), *tinea capitis* (couro cabeludo), *tinea unguium* (unha, também conhecida como onicomicose), *tinea manuum* (mãos), *tinea faciei* (face), *tinea barbae* (barba), *tinea cruris* (virilha) e *tinea pedis* (“pé de atleta”), *tinea gladiatorum* (*tinea corporis* visto em lutadores) (FERGUSON; FULLER, 2017).

Candida é um gênero heterogêneo com mais de 150 espécies e embora tenha sido originalmente descrita como membro do grupo artificial de “fungos imperfeitos”, muitas espécies como *C. albicans* apresentam conjuntos completos de genes necessários para a reprodução sexual e parasexual. Muitos trabalhos recentes enfatizaram a importância da diversificação genômica de *C. albicans* como sua estratégia para se adaptar a ambientes mutáveis, incluindo a exposição a fármacos (HICKMAN et al., 2013; KOEHLER et al., 2017). Na prática clínica, devido à dificuldade de demonstrar-se a capacidade de formar um estágio sexual, as espécies são mais frequentemente classificadas como fungos imperfeitos (MCCULLOUGH; ROSS; READE, 1996).

A primeira espécie de *Candida* foi descrita por Robin em 1847. Desde então, o gênero ganhou várias nomenclaturas a) baseado no crescimento em ágar Sabouraud e ágar sangue de extrato

de carne; b) análise das características microscópicas em ágar de fubá de milho e c) fermentação de açúcares (MACKINNON; ARTAGAVEYTIA-ALLENDE, 1944; MCCULLOUGH; ROSS; READE, 1996). Em 1970, Van Uden e Buckley incluíram 81 espécies de *Candida* e sete variedades (MACKINNON; ARTAGAVEYTIA-ALLENDE, 1944; MCCULLOUGH; ROSS; READE, 1996).

Existem espécies relacionadas aos ascomicetos e basidiomicetos. Dentro dos ascomicetos, a ordem Saccharomycetales contém muitas espécies de importância clínica e interesse científico, incluindo várias espécies patogênicas para humanos, como *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. albicans*, que é o fungo patogênico humano mais comum (CALDERONE, 2001). Espécies de afinidade com basidiomicetos são caracterizadas por uma parede celular lamelar ou multicamadas, brotamento enteroblástico e são positivos a *Diazonium Blue B*, enquanto os ascomicetos são distinguidos por uma parede celular de duas camadas, brotamento holoblástico e negativo ao teste de *Diazonium Blue B* (VILJOEN; KOCK, 1989).

O uso de técnicas moleculares na taxonomia mostrou que as características fenotípicas por si só são inadequadas na construção de um sistema de classificação (DANIEL; LACHANCE; KURTZMAN, 2014; KURTZMAN; ROBNETT, 1998). Por outro lado, resultou em mudanças dentro do grupo e reconhecimento de novas espécies como *C. dubliniensis* (SEGAL; ELAD, 2010; SULLIVAN et al., 1995) e *C. auris* (SPIVAK; HANSON, 2018). Atualmente, o banco de dados de literatura SCOPUS, reconhece 434 espécies de *Candida* (DANIEL; LACHANCE; KURTZMAN, 2014), das quais, 40 já foram descritas como patogênicas (ARAÚJO; HENRIQUES; SILVA, 2016; GHAZI et al., 2019). As recentes análises filogenéticas, mostraram que as espécies de *Candida* representam um grupo polifilético e com isso, a nomenclatura das espécies de *Candida* continua sendo profundamente revista nos últimos anos (GHAZI et al., 2019; PAPON et al., 2013).

1.2. Epidemiologia

A prevalência da dermatofitose é altamente variável, pois depende de parâmetros climáticos como umidade e temperatura e das características de cada paciente, como idade, sexo, predisposição a doenças, localização anatômica da lesão, nível socioeconômico, ocupação laboral condições climáticas e estilo de vida (HEIDRICH et al., 2015; SEGAL; FRENKEL, 2015). A dermatofitose é considerada a zoonose dermatológica mais comum no mundo. Acredita-se que a sua prevalência esteja em torno de 20-25% da população humana mundial (FAWAY et al., 2016; IVASKIENE et al., 2016). Nas duas últimas décadas, houve um aumento significativo das infecções por dermatófitos devido a mudanças nos padrões de migração, crescimento no turismo, mudanças nas condições socioeconômicas e estado imunológico do hospedeiro. No entanto, as espécies que eram restritas a uma localização geográfica específica como *T. concentricum*, endêmico no Pacífico Sul e em certas regiões da América do Sul e, raramente encontrado na Europa, estão sendo isoladas em várias partes do mundo (AGGARWAL; GOINDI, 2012; CAI et al., 2016; COSTA-ORLANDI et al., 2012; MARAKI; MAVROMANOLAKI, 2016).

T. rubrum é a espécie de dermatófito mais prevalente no mundo sendo responsável por mais de 80% das infecções. Essa espécie é comumente isolada em casos de onicomicose, *tinea corporis*, *tinea cruris* e *tinea pedis* (FAWAY et al., 2016; ZHAN; LIU, 2017). Nos últimos anos foi observado crescimento de número de casos de *tinea capitis* causados por espécies zoofílicas, nomeadamente, *T. mentagrophytes*, *T. verrucosum* e *M. canis* nas maiores cidades do mundo, principalmente em crianças abaixo de 12 anos, devido a maior aproximação do homem com os animais de estimação, principalmente cães e gatos (IVASKIENE et al., 2016; VEASEY et al., 2017; ZHAN; LIU, 2017). Zhan & Liu (2017) especulam que o estilo de vida moderna, leva à melhoria da higiene e da quarentena dos animais, deste modo, futuramente os animais de estimação passarão de infecções por

espécies zoofílicas para infecções por espécies antropofílicas (*T. rubrum*, *T. tonsurans* e *T. violaceum*).

Já as espécies do gênero *Candida* são os principais agentes causadores de infecções fúngicas no mundo todo, associada a alta morbimortalidade constituindo deste modo, um problema de saúde pública (ARAÚJO; HENRIQUES; SILVA, 2016). Alguns estudos epidemiológicos indicam que na prática clínica, infecções por espécies de *Candida* e dermatófitos podem coexistir, com predomínio de *Candida* nos isolados das unhas de mãos e pés, em especial *C. parapsilosis* e *C. albicans* e concomitante com *T. rubrum*, *T. interdigitale* ou *M. gypseum* (COSTA-ORLANDI et al., 2012b; MARTINS et al., 2007).

1.3. Patogenia

A infecção por dermatófitos ocorre por contato direto com humanos ou animais infectados, ou ainda, de forma indireta por meio de objetos contaminados, principalmente toalhas, aparelhos de manicure, escovas de cabelo, roupas e sapatos (MENDEZ-TOVAR, 2010). O estabelecimento da infecção depende da capacidade do fungo de superar as barreiras naturais do hospedeiro, como a acidez da pele, presença de ácidos graxos e peptídeos antimicrobianos, ação de células fagocíticas e descamação da pele (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2017). Algumas regiões do corpo como a parte distal da unha, região interdigital e couro cabeludo são mais susceptíveis ao desenvolvimento de infecções, devido a fatores anatômicos e ambientais como umidade e pH alcalino que favorecem o crescimento dos dermatófitos (MENDEZ-TOVAR, 2010).

Esses fungos produzem adesinas que são responsáveis pela fixação na superfície do hospedeiro, uma vez aderidos ao tecido queratinizado, liberam lipases, ceramidases e enzimas proteolíticas como queratinases, metaloproteases e proteases que digerem a rede de queratina em oligopeptídeos ou aminoácidos assimiláveis que servem, por sua vez, de fonte de nutrição para o

fungo (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2017; MENDEZ-TOVAR, 2010; VERMOUT et al., 2008).

As primeiras células a serem infectadas são os queratinócitos, os quais expressam um perfil diferente de citocinas em resposta às diferentes espécies envolvidas e que se correlaciona com a reação inflamatória desencadeada. Os queratinócitos infectados por espécies zoofílicas, expressam genes pró-inflamatórios e secretam citocinas como interleucinas (IL)-2 e interferon (IFN)- γ para promover o recrutamento de células inflamatórias, remodelação tecidual e cicatrização de feridas. Entretanto, as espécies antropofílicas induzem expressão limitada de genes da inflamação e secreção de citocinas (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2017; SHIRAKI et al., 2006; VERMOUT et al., 2008). Deste modo, as espécies zoofílicas ou geofílicas induzem uma resposta inflamatória intensa enquanto as antropofílicas induzem uma resposta mais branda favorecendo o desenvolvimento de doença crônica. Em indivíduos imunocomprometidos, os dermatófitos além de infectar tecidos queratinizados podem invadir e infectar tecido subcutâneo ou até mesmo uma infecção sistêmica, provocando um quadro mais grave (AMEEN, 2010; IVASKIENE et al., 2016; MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2017; VERMOUT et al., 2008).

Espécies do gênero *Candida* são amplamente distribuídos na natureza e agem como saprofitas comuns, constituindo também a microbiota humana normal. No entanto, quando há alterações (físicas, químicas e imunológicas) no ambiente hospedeiro, elas podem proliferar e se tornam patogênicas (PAPON et al., 2013). A candidíase cutânea ocorre geralmente em regiões com elevada umidade em dobras corporais (dobras inguinais, axilares, submamária, interglúteos, comissuras dos lábios) e espaços interdigitais, ou ainda em dobras das unhas desenvolvendo onicomicose. Nas unhas, destruição da cutícula ou manicure intensiva facilita a entrada de *Candida* abaixo da dobra supraungueal. O uso de fraldas favorece o aparecimento de candidíase nas nádegas

de recém-nascidos e idosos. Alguns fatores gerais também podem ser a causa como diabetes descompensado, corticoterapia sistêmica e outros tratamentos imunossupressores (HAY, 2017).

Candida pode causar desde infecções superficiais (cutâneas, mucocutâneas, onicomicose) até infecções sistêmicas (meningite, sepse, candidemia, entre outras) (FRÍAS-DE-LEÓN et al., 2019). Embora a maioria dos casos de candidíase é atribuída a *C. albicans*, nas últimas décadas, houve aumento de infecções envolvendo espécies não *albicans* particularmente *Candida glabrata* (renomeada *Nakaseomyces glabrata*), *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei* (renomeada *Pichia kudriavzevii*) (ARAÚJO; HENRIQUES; SILVA, 2016; GHAZI et al., 2019; PRISTOV; GHANNOUM, 2019). Vários fatores foram implicados para esse aumento da incidência, mas, no entanto, o uso crescente e disseminado de certas práticas médicas, como terapias imunossupressoras, procedimentos cirúrgicos invasivos e uso de antibióticos de amplo espectro são significativos (SADEGHI et al., 2018).

Um dos principais fatores de virulência das espécies de *Candida* é a formação de biofilmes (ARAÚJO; HENRIQUES; SILVA, 2016; SAWANT; KHAN, 2017). Recentemente foi descoberto que espécies de dermatófitos também são capazes de formarem comunidades *in vitro* (COSTA-ORLANDI et al., 2014; DANIELLI et al., 2017). Biofilmes fúngicos são considerados comunidades sésseis altamente estruturadas e organizadas que aderem fortemente a um substrato biológico ou artificial e são protegidos por uma matriz extracelular polimérica que eles mesmos produzem (COSTA-ORLANDI et al., 2017; RAMAGE et al., 2009). Os biofilmes fúngicos apresentam geralmente uma arquitetura tridimensional complexa com extensa heterogeneidade espacial, incluindo micro colônias e canais de água ramificados, embora, suas propriedades estruturais possam variar dependendo das espécies de fungos, tipo de substrato e condições de crescimento (BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006; NETT; ANDES, 2006; VILA et al., 2017). Esta organização, constitui um arranjo espacial ideal para a absorção de nutrientes, excreção de produtos metabólicos, proteção contra o meio ambiente, comunicação célula – célula, regulação comunitária da expressão

genética e pode incluir algum grau de especialização de células dependendo da localização dentro do biofilme (RABIN et al., 2015; SOLL; DANIELS, 2016; VILA et al., 2017).

O processo de formação de biofilme desencadeia vários mecanismos como o “*quorum-sensing*” (comunicação célula - célula por via de pequenas moléculas semelhantes à hormônios liberados por células de biofilme) bem como interações adesivas, célula - célula e célula - substrato com vista a secreção de fatores de virulência, melhor cooperação metabólica e regulação comunitária da expressão gênica (NOBILE; MITCHELL, 2005; RABIN et al., 2015; SARDI et al., 2014; VILA et al., 2017). Para que haja a comunicação entre as células, a matriz extracelular contribui com as forças coesivas e adesivas para a estabilidade arquitetônica e mecânica do biofilme, atuando essencialmente como uma “cola” que mantém as células unidas e ligadas à superfície (MITCHELL, KAITCHELL; ZARNOWSKI; ANDES, 2016).

A matriz extracelular é constituída majoritariamente por carboidratos e proteínas, entretanto, lipídios e ácidos nucleicos podem estar presentes. Do ponto de vista fisiológico, a matriz do biofilme atua como uma barreira de proteção, protegendo das defesas do hospedeiro, prevenindo a penetração de fármacos e contribuindo, desse modo, para a resistência do biofilme e manutenção das infecções associadas aos biofilmes (COSTA-ORLANDI et al., 2017; MITCHELL, KAITCHELL; ZARNOWSKI; ANDES, 2016; VILA et al., 2017).

Poucos estudos relacionam os dermatófitos e a formação de biofilmes *in vivo*. Os primeiros relatos sobre a formação de biofilmes por dermatófitos foram hipotetizados por Burkhart; Burkhart & Gupta, (2002) ao relacioná-los com os dermatofitomas formados nas onicomicoses refratárias. Esses dermatofitomas foram caracterizados por massas brancas circunscritas dentro e sobre a unha e poderiam ser considerados biofilmes, mediante a presença de elementos fúngicos vivos e com aparência normal na parte central como artroconídios e hifas, forte aderência e difícil remoção da

placa ungueal, existência de células dormentes, maior resistência aos fármacos convencionais, possibilidade de apresentar mais de um tipo de microrganismo.

A partir daí houve maior interesse na investigação da capacidade de formação desses biofilmes. Com isso, nosso grupo caracterizou pela primeira vez a formação de biofilme *in vitro* por duas espécies mais prevalentes no mundo, nomeadamente, *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes* (COSTA-ORLANDI et al., 2014). Em seguida, Danielli et al. (2017) demonstrou que *M. canis* também é capaz de formar biofilme *in vitro*.

Os biofilmes formados por espécies de *Candida* são os mais estudados (COSTA-ORLANDI et al., 2017; HARDING et al., 2009; SARDI et al., 2013). A habilidade de formação de biofilmes das espécies de *Candida* foi descoberta desde os meados dos anos 90 e, logo aumentaram estudos da estrutura, da resistência aos fármacos bem como interação interespecies dessas comunidades (HARDING et al., 2009; KUMAMOTO, 2002; RAMAGE et al., 2002). Foi com isso, demonstrado que a estrutura dos biofilmes é bastante heterogênea, composto por camadas densas de blastoconídios de leveduras, hifas, pseudo-hifas principalmente em *C. albicans* (BONHOMME; ENFERT, 2013; PARAMONOVA et al., 2009). Os biofilmes formados por *C. parapsilosis* são compostos por leveduras e pseudo-hifas, embora podem ser compostos apenas por células de leveduras. A diferença na morfologia é regulada pela expressão gênica comunitária sinalizada por *quórum sensing* (COSTA-ORLANDI et al., 2017; PIRES et al., 2011). Em geral, a formação de biofilmes na clínica está intimamente relacionada a instrumentos médicos como cateteres, próteses ortopédicas, cardíacas e vasculares, tornando-se uma complicação crescente da hospitalização e aumento da morbimortalidade (OLIVEIRA et al., 2018; PIRES et al., 2011; RAMAGE et al., 2002).

1.4. Tratamento

O tratamento das dermatofitoses é geralmente longo, podendo levar de três a doze meses dependendo da extensão da infecção, do local afetado e da espécie dermatofítica envolvida em cada

caso (GUPTA; DAIGLE; CARVIEL, 2016; IVASKIENE et al., 2016). Ele é baseado no uso de antifúngicos tópicos e sistêmicos (AGGARWAL; GOINDI, 2012; GUPTA; COOPER, 2008; ZHANG et al., 2018a). Para tratar as dermatofitoses que causam respostas inflamatórias intensas, como *tinea cruris* ou *tinea capitis*, é recomendada a combinação com corticosteróides leves à moderados, a fim de reduzir a inflamação. Esta terapia de combinação proporciona alívio rápido do prurido, facilita a cicatrização, e evita arranhões que podem propagar a infecção (ZHANG et al., 2018a).

A maioria dos agentes antifúngicos usada para o tratamento da dermatofitose mesmo quando novos, está inserida dentro de duas principais famílias: azóis e alilaminas (AGGARWAL; GOINDI, 2012; GUPTA; COOPER, 2008). Embora exista uma quantidade razoável de fármacos antifúngicos e nas duas últimas décadas houve avanços em seu desenvolvimento, a ocorrência de recidivas em casos de onicomicose está em torno de 50% (GUPTA; DAIGLE; CARVIEL, 2016; SINGH et al., 2018a).

Os derivados azólicos como clotrimazol, miconazol, econazol, oxiconazol, tioconazol são mais comumente prescritos para tratar infecções fúngicas superficiais localizadas como *tinea corporis*, *tinea cruris* ou *tinea pedis* em estágios iniciais por via tópica. Entretanto, podem existir formulações tópicas contendo terbinafina e naftifina da família das alilaminas ou ainda ciclopirox e amorolfina (AGGARWAL; GOINDI, 2012; GUPTA; COOPER, 2008; TAMURA et al., 2014). As taxas de cura em dermatofitose no estágio inicial são altas, com resolução da infecção em duas a quatro semanas de terapia tópica, dependendo do quadro clínico (GUPTA et al., 2003; OUF et al., 2013). Após a aplicação tópica, podem ser observados efeitos adversos como reações cutâneas leves e transitórias no local da aplicação. A segurança da terapia é menos preocupante para medicações tópicas, pois a absorção tende a ser mínima (ZHANG et al., 2018a).

A griseofulvina, a terbinafina e os novos azóis como itraconazol, fluconazol, e cetoconazol são formulações orais geralmente usadas para os casos de onicomicose e/ou infecções crônicas superficiais, podendo ser feitas associações com agentes tópicos como ciclopirox e amorolfina (AGGARWAL; GOINDI, 2012; GUPTA; COOPER, 2008). A griseofulvina tem se mostrado com baixa eficácia em casos de onicomicose devido a sua baixa afinidade à queratina (YENİŞEHİRLİ et al., 2013).

Os azóis têm sido amplamente utilizados como agentes antifúngicos na prática clínica devido ao seu amplo espectro antifúngico, alto índice terapêutico e baixa toxicidade em relação à outras famílias de antifúngicos. Infelizmente, o amplo uso de azóis levou ao desenvolvimento de resistência severa que reduziu significativamente a eficácia destes compostos (OUF et al., 2013). A terbinafina é considerada padrão ouro para o tratamento da dermatofitose, por ela apresentar maior eficácia antifúngica em relação aos outros agentes (OUF et al., 2013; YENİŞEHİRLİ et al., 2013; ZHANG et al., 2018a).

Devido ao longo período de tratamento e o fato de que a maioria dos agentes antifúngicos utilizados para o tratamento tem como alvo o ergosterol da membrana celular fúngica, que é análogo ao colesterol, molécula que está presente na membrana celular de mamíferos, os agentes sistêmicos estão associados a um considerável poder de toxicidade às células humanas. São relatados casos de toxicidade hepática, renal e da pele como a síndrome de Stevens-Johnson devido a interações medicamentosas no sistema do citocromo p450. Deste modo, na administração destes fármacos deve ser realizado simultaneamente, o monitoramento das funções hepáticas, renais e hematopoiéticas (GUPTA; COOPER, 2008).

Os estudos conduzidos na atualidade estão voltados para a pesquisa da capacidade antibiofilme dos fármacos usados convencionalmente para o tratamento da dermatofitose como terbinafina, fluconazol (GARCIA et al., 2020), itraconazol, voriconazol, griseofulvina

(BRILHANTE et al., 2018), econazol (TOUKABRI et al., 2018) e de formulações de xampus (DOS SANTOS & DIAS-SOUZA, 2017). No entanto, ainda não foi descoberto fármaco promissor, ou seja, na maioria das vezes é necessário 50 vezes mais a concentração inibitória mínima para se observar alguma inibição do biofilme. Essas doses podem simbolizar riscos aos pacientes, já que os fármacos antifúngicos apresentam um elevado grau de toxicidade hepática e renal. Esses dados mostram que a busca de alternativas terapêuticas para o tratamento dessa enfermidade e, particularmente, as onicomicoses são de extrema importância (GUPTA; COOPER, 2008).

Compostos antifúngicos usados atualmente para tratar candidíase pertence a três famílias: polienos, azóis e equinocandinas. Antifúngicos azólicos, como o fluconazol (FCZ), é frequentemente o tratamento preferido para muitas infecções por *Candida*, pois são baratos, exibem toxicidade limitada e estão disponíveis para administração oral. Entretanto, nos últimos 10 anos, existe extensa documentação de padrões de resistência primária ou suscetibilidade reduzida a antifúngicos, principalmente os azólicos (PAPON et al., 2013; SADEGHI et al., 2018). Com isso, foram desenvolvidas estratégias utilizando terapias combinadas de vários antifúngicos, como anfotericina B e equinocandinas ou anfotericina B e azólicos. A resistência dos biofilmes a diferentes fármacos depende de vários fatores como espécie e fisiologia dos microrganismos, a densidade celular do biofilme, o número de moléculas alvo, a presença de bombas de efluxo (RODRÍGUEZ-CERDEIRA et al., 2019). Estudos mostraram que os biofilmes formados por dermatófitos são resistentes aos antifúngicos convencionais como fluconazol, gliseoflulvina, voriconazol, itraconazol inclusive a terbinafina considerada padrão ouro de tratamento (BRILHANTE et al., 2018; COSTA-ORLANDI et al., 2020, 2021; GARCIA et al., 2020)

1.5. Alternativas terapêuticas

A difícil erradicação, a toxicidade dos fármacos e a alta taxa de recidivas tornaram emergente a busca de alternativas terapêuticas para as dermatomicoses e, principalmente as

associadas à formação de biofilmes. Já foi avaliado o efeito antidermatofítico de alguns compostos como óleos essenciais de plantas (MAHBOUBI; HEIDARYTABAR; MAHDIZADEH, 2017), extratos de plantas (MAHBOUBI; KAZEMPOUR, 2015; SUN et al., 2017), gás ozônio, óleo ozonizado (OUF et al., 2016) e inativação fotodinâmica (DE OLIVEIRA et al., 2015; PAZ-CRISTOBAL et al., 2014; SHAMALI et al., 2018), entre outros.

1.5.1. Chalconas

Chalconas ou 1,3-difenil-2-propen-1-ona são compostos poli-hidroxilados, precursores de flavonóides e isoflavonoides, abundantes em frutas, vegetais e plantas comestíveis (FU et al., 2016; GUPTA; JAIN, 2015; KARIMI-SALES; MOHADDES; ALIPOUR, 2017). No entanto, estes componentes podem ser sintetizados em laboratório por meio do método de condensação de Claisen-Schmidt (KARIMI-SALES; MOHADDES; ALIPOUR, 2017). As chalconas têm sido amplamente estudadas por possuírem atividades biológicas como anti-inflamatória, antitumoral (KHANAPURE et al., 2018), antioxidante (SINGH et al., 2018b), antidiabética (CAI et al., 2017), antibacteriana (SINGH et al., 2018a), antifúngica (FU et al., 2016; GUPTA; JAIN, 2015; ILLICACHI et al., 2017), antiprotozoária (ILLICACHI et al., 2017; TAJUDDEEN et al., 2018), antiparasitária (KOTLYAR et al., 2019), contra doença de Alzheimer (ZHANG et al., 2018c), inibidor de colinesterase (SHAH et al., 2018), entre outras atividades.

A propriedade antimicrobiana das chalconas está relacionada à presença de uma função carbonila α e β insaturada reativa na molécula, enquanto as propriedades antifúngicas estão presentes em algumas chalconas sintéticas fenólicas inibindo a β -(1,3) glucana e quitina sintases, enzimas que catalisam a biossíntese de polímeros de β -(1,3) glucana e quitina da parede celular fúngica, respectivamente (GUPTA; JAIN, 2015; ILLICACHI et al., 2017; WEI et al., 2015). São relatadas também que as chalconas são capazes de inibir a glutathione-S-transferase (GST), enzimas que demonstraram estar envolvidas na resistência aos fármacos (LÓPEZ et al., 2001; WEI et al., 2015).

Assim, as chalconas e seus derivados são potenciais candidatos para investigação de nova linha terapêutica segura, sem afetar o hospedeiro (GUPTA; JAIN, 2015). Elas também apresentam características significativas para o efeito da terapia fotodinâmica como a presença de grupos fenólicos em sua estrutura que promovem um estado excitado tripleto da molécula com tempo de vida longo e possui um alto rendimento quântico de formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (MELO et al., 2017). Uma série de derivados de chalcona foram sintetizados e avaliados para atividade antifúngica contra espécies de fungos como *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Microsporum gypseum*, *Cryptococcus gattii* (PALANCO et al., 2017), *Paracoccidioides* spp (MEDINA-ALARCÓN et al., 2020) e *Histoplasma capsulatum* (MELO et al., 2017), mostrando valores de CIM entre 0,4 a 15,6 mg/L.

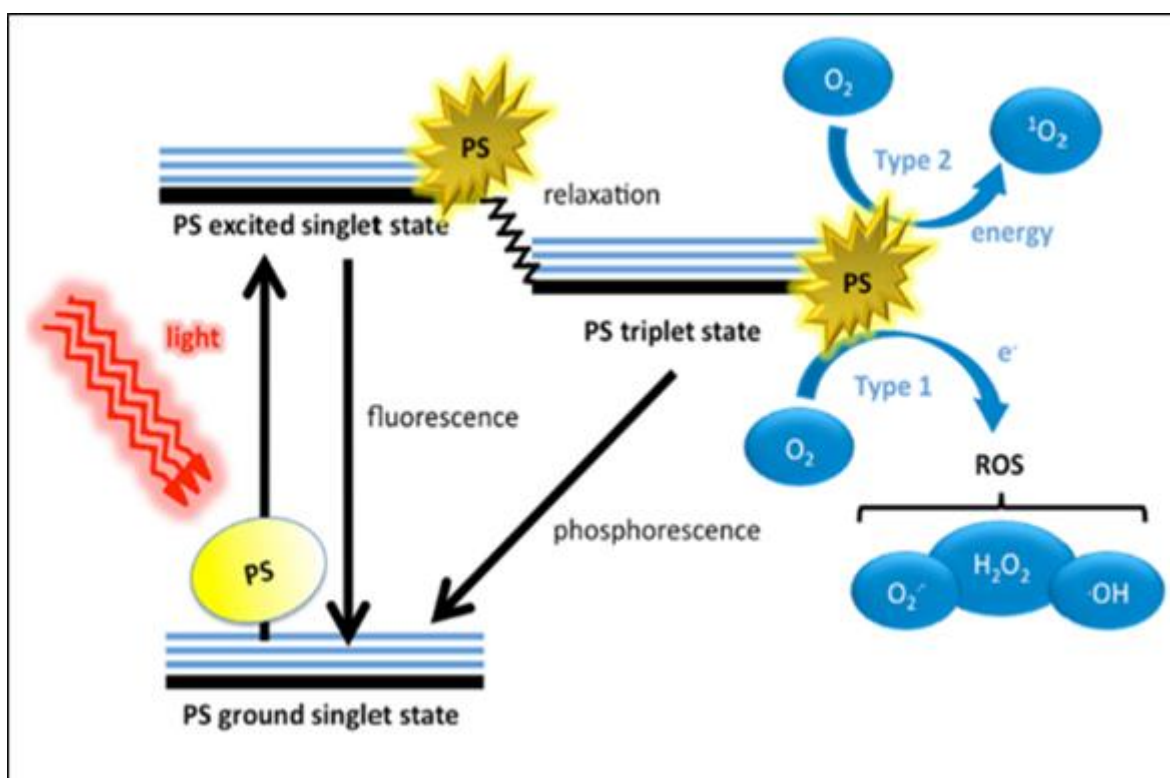
1.5.2. Terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica é um tratamento não invasivo, que consiste no uso de uma luz de um comprimento de onda específico para ativação de um agente fotossensível na presença de oxigênio, resultando em produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e radicais livres e consequentemente morte celular (DAVIES et al., 2016; SILVA et al., 2017; YANG et al., 2017; YUAN et al., 2017).

A ativação do fotossensibilizador (PS) por irradiação resulta na transição de elétrons para um orbital diferente, excitando o PS que passa do estado fundamental (estado singleto S₀) para a forma de uma molécula instável com uma meia-vida curta (estado singleto excitado S₁). No estado S₁ o PS pode decair de volta ao estado fundamental emitindo fluorescência ou sofrer cruzamento intersistema pelo qual o *spin* de seu elétron excitado se inverte para formar um estado de tripleto (T₁) (HOORELBEKE et al., 2018; SHIBU et al., 2013; ZHANG et al., 2018b). A vida útil do estado T₁ é mais longa do que a de S₁, o que facilita as interações estendidas do PS com as moléculas circundantes. Entretanto, o estado T₁ também pode decair e voltar ao estado fundamental emitindo

fosforescência. As interações com moléculas circundantes podem ser do tipo I e do II. As interações do tipo I envolvem retirada de um átomo de hidrogênio, ou a transferência de um elétron entre PS excitado e um substrato (membrana celular ou outras biomoléculas) resultando em radicais livres. O mecanismo do tipo II envolve a transferência de energia entre PS excitado e oxigênio molecular também chamado oxigênio tripleto ($^3\text{O}_2$). Esta transferência de energia resulta na formação de ROS como oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila. As ROS devido a sua vida curta, reagem imediatamente com biomoléculas vitais, causando danos celulares (Fig. 1) (SHIBU et al., 2013; ZHANG et al., 2018b).

Figura 1: Representação esquemática do mecanismo da terapia fotodinâmica pelo diagrama de Jablonski, mostrando os principais eventos que levam as reações fotoquímicas do tipo I e do tipo II, que resultam em danos celulares oxidativos. PS- fotossensibilizador; $^3\text{O}_2$ -oxigênio tripleto; $^1\text{O}_2$ -oxigênio singleto (FOOTE, 1991).



A terapia fotodinâmica é uma modalidade promissora devido à sua eficácia contra uma ampla gama de espécies de microrganismos (SILVA et al., 2017). Já se sabe que a inativação

fotodinâmica de microrganismos pode ocorrer em cepas sensíveis ou resistentes à fármacos convencionais (MAI et al., 2017). Vários estudos investigaram o efeito fungicida da terapia fotodinâmica contra *Candida* e constatou-se que as ROS interrompem a membrana citoplasmática do fungo causando um aumento da permeabilidade celular e danos subsequentes à alvos intracelulares (DAVIES et al., 2016; SILVA et al., 2017). Há pesquisas que apontam efetividade da terapia fotodinâmica contra *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* usando o cloridrato de metil aminolevulinato (DE OLIVEIRA et al., 2015), toluidina (BALTAZAR et al., 2013) e hipericina (PAZ-CRISTOBAL et al., 2014) como fotossensibilizadores.

1.6. Modelos alternativos para estudo de toxicidade e eficácia antifúngica de novas moléculas

O principal objetivo dos testes de toxicidade/segurança e eficácia pré-clínica na indústria farmacêutica é prever e prevenir possíveis complicações que podem ocorrer na clínica (BRANNEN et al., 2016; JEMEL et al., 2020). Esses ensaios são classicamente realizados em roedores (camundongos, ratos e coelhos). Apesar de sua alta relevância, os modelos de pequenos mamíferos têm desvantagens significativas. Em particular, eles requerem infraestruturas onerosas e exclusivas, maior espaço para manter um número suficiente de animais necessários para obter dados estatisticamente relevantes, durações de experimentação longo e têm longos tempos de reprodução, que atrasam o progresso da experimentação sem contar com as considerações éticas que limitam seu uso (JEMEL et al., 2020; TSAI; LOH; PROFT, 2016). Por essas razões, vários métodos foram ou estão sendo desenvolvidos para avaliar a toxicidade reprodutiva, de desenvolvimento e eficácia durante o uso de novas moléculas, incluindo ensaios com tecidos ou cultura de embriões ou ainda modelos *in vivo* não mamíferos como *Caenorhabditis elegans*, *Galleria mellonella* e *Drosophila melanogaster* (BRANNEN et al., 2016).

Modelos alternativos de toxicidade reprodutiva e de desenvolvimento tornaram-se consistentes com os princípios dos 3Rs (redução, refinamento e substituição) de animais para avaliação de risco

regulatório. O conceito dos 3Rs foi descrito por Russell e Burch (1959) que discute o uso de abordagens alternativas e substituição de animais com sistema nervoso completo para minimizar o sofrimento animal na pesquisa e recentemente foi revisado por Tannenbaum e Bennett (2015). Desde a introdução do conceito, foram formadas várias organizações para promover a ciência humana e o uso de animais alternativos em pesquisas em testes de segurança de produtos e educação (BRANNEN et al., 2016).

1.6.1. *Galleria mellonella*

G. mellonella (grande traça de cera) é um inseto da ordem Lepidoptera e a família Pyralidae. O inseto é de distribuição cosmopolita e, na natureza, alimentam-se de cera de abelha e pólen, e são encontrados principalmente em colmeias enfraquecidas com pequenas populações (SINGKUM et al., 2019; TSAI; LOH; PROFT, 2016).

As larvas da *G. mellonella* têm sido amplamente utilizadas como modelo experimental na investigação da virulência microbiana e eficácia de agentes antimicrobianos, bem como toxicidade de moléculas experimentais. Várias vantagens contribuem ao uso deste animal alternativo como hospedeiro experimental: (i) o fato de ser mais barato e mais fácil de manter em laboratório sem precisar de equipamentos específicos, em comparação com os modelos de mamíferos, (ii) pode ser facilmente obtido grande número de lavas, uma vez que o ciclo de vida é curto, (iii) apresenta um sistema imunológico inato, que mostra semelhanças notáveis com a resposta imune de vertebrados, (iv) os experimentos podem ser conduzidos em temperaturas que variam de 25 °C a 37 °C e (v) não exigem aprovação ética (CÉ et al., 2020; JEMEL et al., 2020). Além disso, as larvas de *G. mellonella* utilizadas para os ensaios apresentam tamanho conveniente (de 2–3 cm de comprimento e 300mg), que torna fácil de manipular e aplicação de dosagem precisa (SINGKUM et al., 2019).

1.6.2. *Caenorhabditis elegans*

C. elegans é um pequeno nematoide de vida livre encontrado em todo o mundo. Na natureza é geralmente encontrado em solo com matéria vegetal em decomposição rico em bactérias e fungos que servem da sua fonte de alimentação. As larvas recém-eclodidas têm 0,25 milímetros de comprimento e os adultos têm 1 milímetro (HUNT, 2017). *C. elegans* tem uma rica história como modelo de organismo usado em pesquisas em genética, desenvolvimento da biologia, envelhecimento (BEYDOUN et al., 2021) e particularmente, tem crescido estudos de virulência e avaliação toxicologia de novas moléculas utilizando este modelo (SCORZONI et al., 2018). Esses nematoides são um poderoso modelo para estudo da biologia eucariótica, o seu genoma contém 60-80% dos genes que são homólogos aos humanos com 42% deles compreendendo genes causadores de doenças (BRAEMS; TZIORTZOUDA; BOSCH, 2021). Além disso apresentam outras vantagens como: i) o tamanho pequeno que permite a manutenção de milhares de animais em placas de Petri e facilidade de condução de ampla gama de experimentos um pequeno espaço; ii) grande tamanho da ninhada e de curto tempo de geração (300 descendentes por hermafrodita adulto por autofecundação em um ciclo de vida de aproximadamente 3 dias); iii) presença de uma cutícula dura, mas transparente, o que permite a visualização de estruturas internas sem dissecação e facilita o rastreamento de corantes organelares; iv) criopreservação de longo prazo e, v) não reprodução em temperaturas acima de 25 °C (BEYDOUN et al., 2021; HUNT, 2017).

1.6.3. Modelo tridimensional de linhagens celulares

No organismo de indivíduos multicelulares, as células são normalmente rodeadas por uma matriz extracelular ou, estão em contato físico direto com outras células de linhagens iguais ou diferentes. No entanto, nos estudos tradicionais, as linhagens celulares são cultivadas em placas de poliestireno compatível com cultura de células em uma monocamada (modelo 2D) (FENNEMA et al., 2013). Esta abordagem resulta em um ambiente celular homogêneo e bem controlado, facilita a análise microscópica, mudanças de meio e sustenta a proliferação celular por a maioria dos tipos de células.

No entanto, não consegue simular o complexo microambiente biológico do corpo e perde propriedades específicas do tecido, o que resulta em certa discrepância entre os resultados experimentais obtidos *in vitro* e *in vivo* (FENNEMA et al., 2013; SHEN et al., 2021).

Alternativamente, nas abordagens de cultura tridimensionais (3D), as células são cultivadas como agregados, envolvidas em arcabouços 3D ou ainda, são incorporados em géis. A cultura 3D pode simular melhor as interações célula-célula e célula-matriz extracelular *in vivo*, e fornecem uma visão mais realista do microambiente para a cultura de células (CESARZ; TAMAMA, 2016; SHEN et al., 2021). Os agregados têm muitos nomes diferentes; variando de mamosfera, micromassa e esferoides, para tecidos microfabricados (CESARZ; TAMAMA, 2016; FENNEMA et al., 2013). Os esferoides têm recebido grande atenção como um modelo 3D importante para a pesquisa do câncer (KO et al., 2019; LIU; VUNJAK-NOVAKOVIC, 2017), análise de toxicidade de fármacos (BAEK et al., 2016) e engenharia de tecidos (KIM et al., 2019; LUCIANI et al., 2016; SONG et al., 2015).

JUSTIFICATIVA

A necessidade de descoberta de novas moléculas e combinações com propriedades antifúngicas, com novos alvos que sejam exclusivos da célula fúngica é imperativo, face a disponibilidade limitada de medicamentos eficazes para o tratamento da dermatofitose e da candidíase, principalmente associada a formação de biofilmes, a toxicidade dos fármacos antifúngicos disponíveis, as recidivas comuns e o aumento de cepas resistentes. Desde o início dos projetos Biota e Bioprospecta/FAPESP, nosso grupo tem trabalhado com compostos originados da biodiversidade, entre eles, galatos de alquila (DE PAULA et al., 2014; BERNARDI et al., 2017), pedalitina (SANGALLI-LEITE et al., 2016); maitenina e pristimerina (GULLO et al., 2012), chalconas (MEDINA-ALARCÓN et al., 2020; MELO et al., 2017; PALANCO et al., 2017) e derivados do ácido protocatecuico (COSTA-ORLANDI et al., 2020; MEDINA-ALARCÓN et al., 2020, 2017; SOARES et al., 2014). Estudos anteriores demonstraram que a 2-chalcona apresenta propriedades fotossensibilizadoras, possuindo um espectro de absorção em 450nm (MELO et al., 2017). Esse

composto quando combinado com luz laser foi capaz de inibir em 90% o biofilme de *H. capsulatum*. A 2-chalcona é um composto de origem natural, barato, de fácil acesso e disponível na forma sintética, com potencialidades fotossensibilizadoras, capazes de erradicar biofilmes fúngicos, portanto é alternativa terapêutica potencial para tratar dermatomicoses causadas por dermatófitos, espécies de *Candida* ou ainda co-infecções causadas por espécies dos dois gêneros. Além disso, a terapia fotodinâmica contra os biofilmes de dermatófitos ou dual-espécies com *C. albicans* e *C. parapsilosis* nunca foi verificada. Do ponto de vista de saúde pública, a 2-chalcona irá trazer uma alternativa terapêutica mais potente, segura e com redução do tempo de tratamento em dermatomicoses e, especialmente onicomicoses. A descoberta da capacidade de formação de biofilmes *in vitro* dos dermatófitos (COSTA-ORLANDI et al., 2014), a relação hipotética dos mesmos com quadro clínico persistente de onicomicoses (GUPTA; DAIGLE; CARVIEL, 2016), bem como as co-infecções com espécies de *Candida*, principalmente *C. albicans* e *C. parapsilosis* em pacientes com micoses cutâneas (COSTA-ORLANDI et al., 2012a), tem grande importância clínica pois, os biofilmes mostraram-se resistentes a todos os fármacos clinicamente usados nas concentrações terapêuticas (CHAUVIN, 2014; COSTA-ORLANDI et al., 2020; GARCIA et al., 2020). Por outro lado, não existem estudos das interações dos dermatófitos em biofilmes multi-espécies, excetuando-se o realizado pelo nosso grupo, em que se verificou interação antagônica *in vitro* entre *T. rubrum* e *C. albicans*/*C. parapsilosis*, quando os microrganismos foram colocados concomitante ou quando as suspensões de *C. albicans* e *C. parapsilosis* foram adicionadas após a pré-adesão ou maturação dos biofilmes de *T. rubrum*. As leveduras predominaram nos biofilmes mistos em relação ao *T. rubrum* mas, em contra partida, *T. rubrum* inibiu a filamentação principalmente de *C. albicans* que é um fator importante na sua virulência (GARCIA et al., 2020). Desta maneira, o estudo da atividade do sobrenadante dos biofilmes de *T. rubrum*, *C. albicans* e *C. parapsilosis* que levam a inibição da filamentação das leveduras e do crescimento de *T. rubrum*, é imprescindível para alavancar a busca por alternativas terapêuticas contra essas comunidades.

Espera-se ainda a redução de custo e o tempo de tratamento, que são fatores relevantes em sua desistência e conseqüentemente o aparecimento de resistência dos fungos e recidivas frequentes. Por outro lado, o estudo da biodinâmica da 2-chalcona é bastante pertinente de modo a entender melhor o(s) mecanismo(s) de ação envolvidos contra as células fúngicas especialmente dermatófitos.

5. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos, podemos concluir que:

- *M. canis* é capaz de formar biofilme maduro *in vitro* em 96 horas nos meios BHI, HAM-F12, DMEM e RPMI-1640;
- Os meios BHI, HAM-F12, DMEM estimularam a formação de maior quantidade de biomassa e polissacarídeos comparativamente ao meio de cultura RPMI-1640;
- Todas as cepas de dermatófitos testadas na forma planctônica foram sensíveis à 2-chalcona livre e aos antifúngicos testados, com exceção de *T. rubrum* ATCC 28189, que se mostrou resistente ao fluconazol;
- Com relação aos biofilmes, a 2-chalcona mostrou-se mais potente que os fármacos convencionais, para inibir a maturação, quanto para erradicar os biofilmes maduros;
- A combinação entre 2-chalcona + terbinafina e 2-chalcona + fluconazol mostrou-se indiferente contra *T. rubrum* ATCC 28189, *T. rubrum* ATCC MYA-4438 e *T. mentagrophytes* ATCC 11481, quando comparada com a atividade do composto e dos fármacos sozinhos;
- A PDT utilizando a 2-chalcona como fotossensibilizador reduziu em quatro vezes a concentração do composto necessária para inibir células planctônicas, biofilmes em estágio inicial e maduro de dermatófitos;
- O efeito da 2-chalcona foi potencializada com a utilização da luz LED em biofilmes de mono espécie de *C. albicans* e *C. parapsilosis* e biofilmes dual espécies entre *T. rubrum* e *C. albicans*/*C. parapsilosis*;
- A 2-chalcona foi mais tóxica nos modelos *in vitro* em monocamada quando comparados com os modelos tridimensionais, não apresentou toxicidade no modelo *in vivo* de *G. mellonella*;

- O tratamento com a 2-chalcona fotoexcitada é mais seletivo biofilmes maduros de espécies de dermatófitos que nos biofilmes maduros de espécies de *Candida* e biofilmes dual espécies;
- A 2-chalcona tem aparentemente como alvos estruturais a parede e membrana celular, causando desequilíbrio osmótico e extravasamento do conteúdo citoplasmático além disso, promove a geração de ROS, resultando em morte celular por apoptose e necrose;
- A inibição da filamentação de *C. albicans* nos biofilmes mistos de *T. rubrum* e *C. albicans* é influenciada pela interação direta entre os microrganismos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, N.; GOINDI, S. Preparation and evaluation of antifungal efficacy of griseofulvin loaded deformable membrane vesicles in optimized guinea pig model of *Microsporum canis* - Dermatophytosis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 437, n. 1–2, p. 277–287, 2012.

ALIPOUR, M.; MOZAFARI, N. A. Terbinafine susceptibility and genotypic heterogeneity in clinical isolates of *Trichophyton mentagrophytes* by random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Journal de Mycologie Medicale**, v. 25, n. 1, p. e1–e9, 2015.

ALONSO, B. et al. Comparison of the XTT and resazurin assays for quantification of the metabolic activity of *Staphylococcus aureus* biofilm. **Journal of Microbiological Methods**, v. 139, p. 135–137, 2017.

AMEEN, M. Epidemiology of superficial fungal infections. **Clinics in Dermatology**, v. 28, n. 2, p. 197–201, 2010.

ANEKE, C.; OTRANTO, D.; CAFARCHIA, C. Therapy and Antifungal Susceptibility Profile of *Microsporum canis*. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 107, p. 1–14, 2018.

ANSARI, M. J. et al. Effect of Jujube Honey on *Candida albicans* Growth and Biofilm Formation. **Archives of Medical Research**, v. 44, n. 5, p. 352–360, 2013.

ARAÚJO, D.; HENRIQUES, M.; SILVA, S. Portrait of *Candida* Species Biofilm Regulatory Network Genes. **Trends in Microbiology**, v. xx, p. 1–14, 2016.

BAEK, N. et al. Real-time monitoring of cisplatin cytotoxicity on three-dimensional spheroid tumor cells. **Drug, Design, Development and Therapy**, v. 10, p. 2155–2165, 2016.

BAGLA, V. P. et al. Antimicrobial activity, toxicity and selectivity index of two biflavonoids and a flavone isolated from *Podocarpus henkelii* (Podocarpaceae) leaves. **Bio Med Central Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 383, p. 2–7, 2014.

BAIRWA, G. et al. Iron acquisition In fungal pathogens of humans. **Metallomics**, v. 9, n. 3, p. 215–227, 2018.

BALTAZAR, L. M. et al. Photodynamic inhibition of *Trichophyton rubrum*: in vitro activity and the

role of oxidative and nitrosative bursts in fungal death '. **journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. November 2012, p. 354–361, 2013.

BEYDOUN, S. et al. An alternative food source for metabolism and longevity studies in *Caenorhabditis elegans*. **Communications Biology**, v. 4, n. 258, p. 1–9, 2021.

BLANKENSHIP, J. R.; MITCHELL, A. P. How to build a biofilm: a fungal perspective. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 588–594, 2006.

BONHOMME, J.; ENFERT, C. *Candida albicans* biofilms : building a heterogeneous , drug-tolerant environment. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 398–403, 2013.

BRAEMS, E.; TZIORTZOUDA, P.; BOSCH, L. VAN DEN. Neuroscience Letters Exploring the alternative : Fish , flies and worms as preclinical models for ALS. **Neuroscience Letters**, v. 759, p. 1–15, 2021.

BRANNEN, K. C. et al. Alternative Models of Developmental and Reproductive Toxicity in Pharmaceutical Risk Assessment and the 3Rs. **ILAR Journal**, v. 57, n. 2, p. 144–156, 2016.

BRILHANTE, R. S. N. et al. In vitro activity of azole derivatives and griseofulvin against planktonic and biofilm growth of clinical isolates of dermatophytes. **Mycoses**, v. 61, n. 7, p. 449–454, 2018.

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

CAFARCHIA, C. et al. Molecular characterization of selected dermatophytes and their identification by electrophoretic mutation scanning. **Electrophoresis**, v. 30, n. 20, p. 3555–3564, 2009.

CAI, C. Y. et al. Analogues of xanthenes-Chalcones and bis-chalcones as α -glucosidase inhibitors and anti-diabetes candidates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 130, p. 51–59, 2017.

CAI, W. et al. Epidemiology of Superficial Fungal Infections in Guangdong, Southern China: A Retrospective Study from 2004 to 2014. **Mycopathologia**, v. 181, n. 5–6, p. 387–395, 2016.

CANTÓN, E. et al. Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida* species. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 45, n. 3, p. 203–206, 2003.

CAZA, M.; KRONSTAD, J. W. Shared and distinct mechanisms of iron acquisition by bacterial and

fungal pathogens of humans. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, n. November, p. 1–23, 2013.

CÉ, R. et al. Galleria mellonella Larvae as an In Vivo Model to Evaluate the Toxicity of Polymeric Nanocapsules. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 20, p. 1486–1494, 2020.

CEN, Y. K. et al. Colorimetric assay for active biomass quantification of Fusarium fujikuroi. **Journal of Microbiological Methods**, v. 155, n. November, p. 37–41, 2018.

CESARZ, Z.; TAMAMA, K. Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells International**, p. 1–11, 2016.

CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K. Candida Biofilms: Development, Architecture, and Resistance. **HHS Public Access**, v. 3, n. 4, p. 1–24, 2016.

CHAUVIN, M. F. DE. Treatment of onychomycosis. **Journal de Mycologie Medicale**, 2014.

CLEARE, L. G. et al. Media Matters! Alterations in the loading and release of Histoplasma Capsulatum Extracellular Vesicles in response to different nutritional milieus. **Cellular Microbiology**, 2020.

COLEMAN, J. J. et al. Characterization of plant-derived saponin natural products against Candida albicans. **ACS Chem Biol**, v. 5, n. 3, p. 321–332, 2011.

CORDERO, R. J. B. et al. Enhanced virulence of Histoplasma capsulatum through transfer and surface incorporation of glycans from Cryptococcus neoformans during co-infection. **Scientific Reports**, v. 6, n. January, p. 1–16, 2016.

COSTA-ORLANDI, C. et al. Fungal Biofilms and Polymicrobial Diseases. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 2, p. 22, 2017.

COSTA-ORLANDI, C. B. et al. Prevalence of Dermatophytosis in a Brazilian Tertiary Care Hospital. **Mycopathologia**, v. 174, p. 489–497, 2012a.

COSTA-ORLANDI, C. B. et al. Prevalence of Dermatophytosis in a Brazilian Tertiary Care Hospital. **Mycopathologia**, v. 174, p. 489–497, 2012b.

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

- COSTA-ORLANDI, C. B. et al. Incorporation of Nonyl Nanostructured Lipid Systems : Effective Alternative for Maintaining Anti-Dermatophytic and Antibiofilm Activities and Reducing Toxicity at High Concentrations. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. June, p. 1–14, 2020.
- COSTA-ORLANDI, C. B. et al. Nitric Oxide-Releasing Nanoparticles Are Similar to E fi naconazole in Their Capacity to Eradicate Trichophyton rubrum Bio fi lms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 1–9, 2021.
- CRAVCHIK, A.; SIBLEY, D. R.; GEJMAN, P. V. Functional Analysis of the Human D 2 Dopamine Receptor Missense Variants *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 42, p. 26013–26017, 1996.
- DANIEL, H.; LACHANCE, M.-A.; KURTZMAN, C. P. On the reclassification of species assigned to Candida and other anamorphic ascomycetous yeast genera based on phylogenetic circumscription. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 104, p. 67–84, 2014.
- DANIELLI, L. J. et al. Biofilm formation by Microsporum canis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 23, n. 12, p. 941–942, 2017.
- DAVIES, A. et al. Cationic Porphyrin-Mediated Photodynamic Inactivation. **journal of physiology and pharmacology**, v. 67, n. 5, p. 777–783, 2016.
- DAVISON, F. D.; MACKENZIE, D. W. R.; OWEN, R. J. Deoxyribonucleic Acid Base Compositions of Mycoplasma. **Journal of General Microbiology**, n. 118, p. 465–470, 1980.
- DBOUK, N. H. et al. Increase of reactive oxygen species contributes to growth inhibition by fluconazole in Cryptococcus neoformans. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 243, p. 1–10, 2019.
- DE HOOG, G. S. et al. Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 182, p. 5–31, 2017.
- DE OLIVEIRA, G. B. et al. The association of fractional CO2 laser 10.600nm and photodynamic therapy in the treatment of onychomycosis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 90, n. 4, p. 468–471, 2015.
- DE OLIVEIRA LIMA, M. I. et al. Investigation of the antifungal potential of linalool against clinical isolates of fluconazole resistant Trichophyton rubrum. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 27, n. 2, p. 195–202, 2017.

DELAUVY, M. et al. Investigating Antifungal Susceptibility in Candida Species With MALDI-TOF MS-Based Assays. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, p. 1–8, 2019.

DRYDEN, M. Reactive oxygen species : a novel antimicrobial. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 3, p. 299–303, 2018.

EL-ANI, A. S. The Cytogenetics of The Conidium in Microsporum Gypseum and of Pleo- Morphism and the Dual Phe- Nomenon in Fungi. **Mycological Society of America**, v. 60, n. 5, p. 999–1015, 1968.

EMMONS, C. W. Dermatophytes: Natural grouping based on the form of the spores and accessory organs. **Archives of Dermatology and Syphilology**, v. 30, n. 3, p. 337–362, 1934.

FAWAY, E. et al. Modeling dermatophytosis in reconstructed human epidermis : A new tool to study infection mechanisms and to test antifungal agents. **Medical Mycology Journal**, v. 0, n. 0, p. 1–10, 2016.

FENNEMA, E. et al. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 108–115, 2013.

FERGUSON, L.; FULLER, L. C. Spectrum and burden of dermatophytes in children. **Journal of Infection**, v. 74, p. S54–S60, 2017.

FOOTE, C. S. Definition of Type I and Type II. **Photochemistry and Photobiology**, v. 54, n. 5, p. 659, 1991.

FRÍAS-DE-LEÓN, M. G. et al. Superficial candidosis by Candida duobushaemulonii: An emerging microorganism. **Infection, Genetics and Evolution**, 2019.

FRIEDRICH, J. et al. Spheroid-based drug screen : considerations and practical approach. **Nature Protocols**, v. 4, n. 3, p. 309–324, 2009.

FU, D. J. et al. Design, synthesis and antiproliferative activity studies of novel dithiocarbamate–chalcone derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 16, p. 3918–3922, 2016.

GABRIELSON, J. et al. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 50, n. 1, p. 63–73, 2002.

GARCIA, L. M. et al. A Two-Way Road : Antagonistic Interaction Between Dual-Species Biofilms

Formed by *Candida albicans* / *Candida parapsilosis* and *Trichophyton rubrum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. 1980, p. 1–15, 2020.

GAWAZ, A.; WEISEL, G. Mixed infections are a critical factor in the treatment of superficial mycoses. **Mycoses**, v. 61, n. 10, p. 731–735, 2018.

GERWIEN, F. et al. Metals in fungal virulence. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 42, n. 1, p. 1–21, 2018.

GHANNOUM, M. et al. Evaluation of the Morphological Effects of TDT 067 (Terbinafine in Transfersome) and Conventional Terbinafine on Dermatophyte Hyphae In Vitro and In Vivo. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 5, p. 2530–2534, 2012.

GHAZI, S. et al. The epidemiology of *Candida* species in the Middle East and North Africa. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 29, p. 245–252, 2019.

GIL-ALONSO, S. et al. Killing kinetics of anidulafungin, caspofungin and micafungin against *Candida parapsilosis* species complex: Evaluation of the fungicidal activity. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 36, n. 1, p. 24–29, 2019.

GRÄSER, Y. et al. Phylogeny and taxonomy of the family Arthrodermataceae (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region. **Medical Mycology**, v. 37, n. 2, p. 105–114, 1999a.

GRÄSER, Y. et al. Molecular taxonomy of *Trichophyton mentagrophytes* and *T. tonsurans*. **Medical Mycology**, v. 37, n. 5, p. 315–330, 1999b.

GRÄSER, Y.; SCOTT, J.; SUMMERBELL, R. The new species concept in dermatophytes - A polyphasic approach. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5–6, p. 239–256, 2008.

GREEN, D. R.; LLAMBI, F. Cell Death Signaling. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 7, p. 1–24, 2015.

GRUMBT, M.; MONOD, M.; STAIB, P. Genetic advances in dermatophytes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 320, n. 2, p. 79–86, 2011.

GUPTA, A. K. et al. Treatments of tinea pedis. **Dermatologic Clinics**, v. 21, n. 3, p. 431–462, 2003.

GUPTA, A. K.; COOPER, E. A. Update in Antifungal Therapy of Dermatophytosis. **Mycopathologia**, v. 166, n. 2, p. 353–367, 2008.

- GUPTA, A. K.; DAIGLE, D.; CARVIEL, J. L. The role of biofilms in onychomycosis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 74, n. 6, p. 1241–1246, 2016.
- GUPTA, D.; JAIN, D. Chalcone derivatives as potential antifungal agents: Synthesis, and antifungal activity. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 6, n. 3, p. 114, 2015.
- HADRICH, I.; AYADI, A. Epidemiology of antifungal susceptibility : Review of literature. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 28, n. 3, p. 574–584, 2018.
- HARDING, M. W. et al. Can filamentous fungi form biofilms? **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 11, p. 475–480, 2009.
- HARRINGTON, B. J.; HAGEAGE, G. J. your lab focus Calcofluor White : A Review of its Uses and Applications in Clinical Mycology and Parasitology. **laboratory Medicine**, v. 34, n. 5, p. 361–367, 2003.
- HAWSER, S. Adhesion of different Candida spp. to plastic: XTT formazan determinations. **Medical Mycology**, v. 34, n. 6, p. 407–410, 1996.
- HAY, R. Superficial fungal infections Key points. **Medicine**, v. 45, n. 11, p. 707–710, 2017.
- HAZEN, K. C. Fungicidal versus fungistatic activity of terbinafine and itraconazole: An in vitro comparison. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 38, n. 5, p. S37–S41, 1998.
- HEIDRICH, D. et al. Dermatophytosis: A 16-year retrospective study in a metropolitan area in southern Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 8, p. 865–871, 2015.
- HICKMAN, M. A. et al. The ‘ obligate diploid ’ Candida albicans forms mating-competent haploids. **Nature**, v. 000, p. 1–6, 2013.
- HONRAET, K.; GOETGHEBEUR, E.; NELIS, H. J. Comparison of three assays for the quantification of Candida biomass in suspension and CDC reactor grown biofilms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 63, n. 3, p. 287–295, 2005.
- HOORELBEKE, D. et al. Calcium, a pivotal player in photodynamic therapy? **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1865, n. 11, p. 1805–1814, 2018.
- HOSIDA, T. Y. et al. Interactions Between Candida albicans and Candida glabrata in biofilms: influence of the strain type, culture medium and glucose supplementation. **Mycoses**, v. 61, n. 4, p. 270–278, 2018.

HOWARD, D. H. Acquisition, transport, and storage of iron by pathogenic fungi. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 3, p. 394–404, 1999.

HUNT, P. R. The *C. elegans* model in toxicity testing. **Journal of Applied toxicology**, v. 37, p. 50–59, 2017.

ILLICACHI, L. A. et al. Synthesis and DFT calculations of novel vanillin-chalcones and their 3-Aryl-5-(4-(2-(dimethylamino)-ethoxy)-3-methoxyphenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazole-1-carbaldehyde derivatives as antifungal agents. **Molecules**, v. 22, n. 9, p. 1–20, 2017.

IVASKIENE, M. et al. Efficacy of Topical Therapy with Newly Developed Terbinafine and Econazole Formulations in the Treatment of Dermatophytosis in Cats. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 19, n. 3, p. 535–543, 2016.

JEMEL, S. et al. *Galleria mellonella* for the Evaluation of Antifungal Efficacy against Medically Important Fungi, a Narrative Review. **Microorganisms**, v. 8, n. 390, p. 1–19, 2020.

JIANG, W. et al. A new diatom growth inhibition assay using the XTT colorimetric method. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C**, p. 13–19, 2016.

JUNG, W. H.; KRONSTAD, J. W. Iron and fungal pathogenesis: A case study with *Cryptococcus neoformans*. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 277–284, 2008.

KARIMI-SALES, E.; MOHADDES, G.; ALIPOUR, M. R. Chalcones as putative hepatoprotective agents: Preclinical evidence and molecular mechanisms. **Pharmacological Research**, v. 129, p. 177–187, 2017.

KASZUBIAK, A. et al. Population structure and evolutionary origins of *Microsporum canis*, *M. ferrugineum* and *M. audouinii*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 4, n. 3, p. 179–186, 2004.

KHANAPURE, S. et al. Anticancer activity of ruthenoceryl chalcones and their molecular docking studies. **Journal of Molecular Structure**, v. 1173, p. 142–147, 2018.

KIM, E. M. et al. Fabrication of core-shell spheroids as building blocks for engineering 3D complex vascularized tissue. **Acta Biomaterialia**, v. 100, p. 158–172, 2019.

KO, J. et al. Tumor spheroid-on-a-chip: a standardized microfluidic culture platform for investigating tumor angiogenesis. **Lab on a Chip**, 2019.

- KOEHLER, F. C. et al. Candida -reactive T cells for the diagnosis of invasive Candida infection of the lumbar vertebral spine. **Mycoses**, n. August, p. 1–5, 2017.
- KOTLYAR, V. M. et al. Photoreactive fused aziridinylpiperazines on the background of 4-substituted chalcones and their benzimidazolic analogs. **Journal of Molecular Structure**, v. 1180, p. 741–746, 2019.
- KRÖBER, A. et al. HapX Mediates Iron Homeostasis in the Pathogenic Dermatophyte *Arthroderma benhamiae* but Is Dispensable for Virulence. **plos one**, v. 9, p. 1–23, 2016.
- KUCHARÍKOVÁ, S. et al. Detailed comparison of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms under different conditions and their susceptibility to caspofungin and anidulafungin. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 9, p. 1261–1269, 2011.
- KUHN, D. M. et al. Antifungal Susceptibility of *Candida* Biofilms : Unique Efficacy of Amphotericin B Lipid Formulations and Echinocandins. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 46, n. 6, p. 1773–1780, 2002.
- KUHN, D. M. et al. Uses and Limitations of the XTT Assay in Studies of *Candida* Growth and Metabolism. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 506–508, 2003.
- KUMAMOTO, C. A. *Candida* biofilms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 608–611, 2002.
- KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, n. 183584, p. 331–371, 1998.
- LIU, Z.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Modeling tumor microenvironments using custom-designed biomaterial scaffolds. **Curr Opin Chem Eng**, v. 11, p. 94–105, 2017.
- LOPES, G. et al. Antifungal Activity of Phlorotannins against Dermatophytes and Yeasts : Approaches to the Mechanism of Action and Influence on *Candida albicans* Virulence Factor. **plos one**, v. 8, n. 8, 2013.
- LÓPEZ, S. N. et al. In vitro antifungal evaluation and structure-activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 8, p. 1999–2013, 2001.

- LUCIANI, N. et al. Acta Biomaterialia Successful chondrogenesis within scaffolds , using magnetic stem cell confinement and bioreactor maturation. **Acta Biomaterialia**, v. 37, p. 101–110, 2016.
- MACKINNON, J. E.; ARTAGAVEYTIA-ALLENDE, R. C. The so-called Genus Candida Berkhoit, 1923. **Journal of bacteriology**, v. 49, n. 4, p. 317–334, 1944.
- MAHBOUBI, M.; HEIDARYTABAR, R.; MAHDIZADEH, E. The anti-dermatophyte activity of Zataria multiflora essential oils. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 27, n. 2, p. 232–237, 2017.
- MAHBOUBI, M.; KAZEMPOUR, N. The anti-dermatophyte activity of Allium hirtifolium Boiss aqueous extract. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 25, n. 1, p. e10–e14, 2015.
- MAI, B. et al. Photodynamic antimicrobial chemotherapy for Staphylococcus aureus and multidrug-resistant bacterial burn infection in vitro and in vivo. **international journal of nanomedicine**, v. 12, p. 5915–5931, 2017.
- MAKIMURA, K. et al. Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 920–924, 1999.
- MARAKI, S.; MAVROMANOLAKI, V. E. Epidemiology of dermatophytoses in crete, greece: A 5-year survey. **Medical Mycology Journal**, v. 57, n. 4, p. E69–E75, 2016.
- MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T. A.; ROSSI, A. Pathogenesis of Dermatophytosis : Sensing the Host Tissue. **Mycopathologia**, v. 182, n. 1, p. 215–227, 2017.
- MARTINEZ, L. R. et al. Demonstration of Antibiofilm and Antifungal Efficacy of Chitosan against Candidal Biofilms, Using an In Vivo Central Venous Catheter Model. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 9, p. 1436–1440, 2010.
- MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Susceptibility of Cryptococcus neoformans biofilms to antifungal agents in vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 3, p. 1021–1033, 2006.
- MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Cryptococcus neoformans biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold, and UV light. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 14, p. 4592–4601, 2007.
- MARTINS, E. A. et al. Onychomycosis : clinical , epidemiological and mycological study in the

municipality of São José do Rio Preto. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 5, p. 596–598, 2007.

MCCULLOUGH, M. J.; ROSS, B. C.; READE, P. C. Candida albicans: A review of its history, taxonomy, epidemiology virulence attributes, and methods of strain differentiation. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 25, n. 2, p. 136–144, 1996.

MEDINA-ALARCÓN, KAILA P. et al. Antifungal activity of 2 -hydroxychalcone loaded in nanoemulsion against paracoccidioides spp. **Future Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 21–33, 2020.

MEDINA-ALARCÓN, K. P. et al. Alkyl protocatechuate-loaded nanostructured lipid systems as a treatment strategy for Paracoccidioides brasiliensis and paracoccidioides lutzii in vitro. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUN, p. 1–12, 2017.

MELO, W. C. M. A. et al. Selective photoinactivation of Histoplasma capsulatum by water-soluble derivatives chalcones. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 18, p. 232–235, 2017.

MENDEZ-TOVAR, L. J. Pathogenesis of dermatophytosis and tinea versicolor. **Clinics in Dermatology**, v. 28, n. 2, p. 185–189, 2010.

MITCHELL, KAITCHELL, F.; ZARNOWSKI, R.; ANDES, D. R. The Extracellular Matrix of Fungal Biofilms. **Adv Exp. Medicine, Biology-Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health**, v. 931, p. 21–35, 2016.

MOCHIZUKI, T. et al. Minipreparation of total cellular DNA is useful as an alternative molecular marker of mitochondrial DNA for the identification of Trichophyton mentagrophytes and T. rubrum. **Mycoses**, v. 39, p. 31–35, 1996.

MORIELLO, K. A. Treatment of dermatophytosis in dogs and cats: an update. **Veterinary Dermatology**, v. 52, n. 15, p. 99–107, 2004.

MOWAT, E. et al. Development of a simple model for studying the effects of antifungal agents on multicellular communities of Aspergillus fumigatus. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 1205–1212, 2007.

NASSER, L. et al. Structural basis of haem-iron acquisition by fungal pathogens. **Nature Microbiology**, n. September, p. 1–10, 2016.

- NCCLS. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing Of Filamentous Fungi M38-A2. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, v. 22, n. 16, 2008.
- NENOFF, P. et al. A clarion call for preventing taxonomical errors of dermatophytes using the example of the novel *Trichophyton mentagrophytes* genotype VIII uniformly isolated in the Indian epidemic of superficial dermatophytosis. **Mycoses**, n. July, p. 1–5, 2018.
- NETT, J.; ANDES, D. Candida albicans biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 340–345, 2006.
- NOBILE, C. J.; MITCHELL, A. P. Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by the C. albicans transcription factor Bcr1p. **Current Biology**, v. 15, n. 12, p. 1150–1155, 2005.
- OCHOA-PACHECO, A. et al. Bioassay - guided In vitro Study of the Antimicrobial and Cytotoxic Properties of the Leaves from Excoecaria Lucida Sw. **Pharmacognosy Research**, v. 9, p. 396–400, 2017.
- OLIVEIRA, D. B. C. DE et al. A new acridone with antifungal properties against Candida spp . and dermatophytes , and antibiofilm activity against C. albicans. **Journal of Applied Microbiology**, v. 127, p. 1362–1377, 2019.
- OLIVEIRA, L. T. et al. Fungal biofilms in the hemodialysis environment. **Microbial Pathogenesis**, v. 123, n. July, p. 206–212, 2018.
- OMMEN, P.; ZOBOK, N.; MEYER, R. L. Quantification of biofilm biomass by staining: Non-toxic safranin can replace the popular crystal violet. **Journal of Microbiological Methods**, v. 141, p. 87–89, 2017.
- OSBORNE, C. S. et al. Amino Acid Substitution in Trichophyton rubrum Squalene Epoxidase Associated with Resistance to Terbinafine. v. 49, n. 7, p. 2840–2844, 2005.
- OUF, S. A. et al. Efficacy of some synthesized thiazoles against dermatophytes. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 23, n. 4, p. 230–236, 2013.
- OUF, S. A. et al. Anti-fungal potential of ozone against some dermatophytes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 697–702, 2016.
- PALANCO, A. C. et al. Activity of 3'-hydroxychalcone against Cryptococcus gattii and toxicity, and

efficacy in alternative animal models. **Future Microbiology**, v. 12, n. 13, p. 1123–1134, 2017.

PAPON, N. et al. Emerging and Emerged Pathogenic Candida Species : Beyond the Candida albicans Paradigm. **PLOS Pathogens**, v. 9, n. 9, p. 1–4, 2013.

PAPPAS, P. G. et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 4, p. e1–e50, 2016.

PARAMONOVA, E. et al. Hyphal content determines the compression strength of Candida albicans biofilms. **Microbiology**, v. 155, p. 1997–2003, 2009.

PAZ-CRISTOBAL, M. P. et al. In Vitro Fungicidal Photodynamic Effect of Hypericin on Trichophyton spp. **Mycopathologia**, v. 178, n. 3–4, p. 221–225, 2014.

PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 72, n. 2, p. 157–165, 2008.

PIATEK, M. et al. Utilising Galleria mellonella larvae for studying in vivo activity of conventional and novel antimicrobial agents. **Pathogens and Disease**, v. 78, n. 8, p. 1–29, 2020.

PIERCE, C. G. et al. 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. 1494–1500, 2008.

PIRES, R. H. et al. 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, Rio de Janeiro**, v. 106, n. September, p. 646–654, 2011.

PITANGUI, N. et al. Adhesion of Histoplasma capsulatum to pneumocytes and biofilm formation on an abiotic surface. **The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, v. 28, n. 7, p. 711–718, 2012.

PRAŻYŃSKA, M.; GOSPODAREK-KOMKOWSKA, E. Paradoxical growth effect of caspofungin on Candida spp. sessile cells not only at high drug concentrations. **Journal of Antibiotics**, v. 72, n. 2, p. 86–92, 2019.

PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of Candida to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 7, p. 792–798, 2019.

- PROTOPOPOVA, M. et al. Identification of a new antitubercular drug candidate , SQ109 , from a combinatorial library of 1 , 2-ethylenediamines. **journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 968–974, 2005.
- RABIN, N. et al. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. **Future Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 4, p. 493–512, 2015.
- RAMAGE, G. et al. Standardized Method for In Vitro Antifungal Susceptibility Testing of Candida albicans Biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 9, p. 2475–2479, 2001.
- RAMAGE, G. et al. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in Candida albicans biofilms. **journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 973–980, 2002.
- RAMAGE, G. et al. Our Current Understanding of Fungal Biofilms Fungal biofilms. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 340–355, 2009.
- RODRÍGUEZ-CERDEIRA, C. et al. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Bio fi lms and vulvovaginal candidiasis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 174, p. 110–125, 2019.
- SADEGHI, G. et al. Emergence of non- Candida albicans species : Epidemiology , phylogeny and fluconazole susceptibility profile. **Journal de Mycologie Medicale**, p. 6–13, 2018.
- SANTOS, R. M. DOS; DIAS-SOUZA, M. V. Effectiveness of five antidandruff cosmetic formulations against planktonic cells and biofilms of dermatophytes. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, n. 2, p. 331–337, 2017.
- SARDI, J. D. C. O. et al. Candida species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 10–24, 2013.
- SARDI, J. D. C. O. et al. Highlights in pathogenic fungal biofilms. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 31, n. 1, p. 22–29, 2014.
- SAWANT, B.; KHAN, T. Biomedicine & Pharmacotherapy Recent advances in delivery of antifungal agents for therapeutic management of candidiasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 2017.
- SCORZONI, L. et al. 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. 391–397, 2007.

SCORZONI, L. et al. Antifungal Efficacy during *Candida krusei* Infection in Non-Conventional Models Correlates with the Yeast In Vitro Susceptibility Profile. **plos one**, v. 8, n. 3, p. 1–13, 2013.

SCORZONI, L. et al. Searching new antifungals: The use of in vitro and in vivo methods for evaluation of natural compounds. **Journal of Microbiological Methods**, v. 123, p. 68–78, 2016.

SCORZONI, L. et al. Evaluation of *Caenorhabditis elegans* as a host model for *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*. **Pathogens and Disease**, v. 76, p. 1–6, 2018.

SEGAL, E.; ELAD, D. Candidiasis. **Microbiology and Microbial Infections**, 2010.

SEGAL, E.; FRENKEL, M. Dermatophyte infections in environmental contexts. **Research in Microbiology**, v. 166, n. 7, p. 564–569, 2015.

SEIDLER, M. J.; SALVENMOSER, S.; MULLER, F. C. *Aspergillus fumigatus* Forms Biofilms with Reduced Antifungal Drug Susceptibility on Bronchial Epithelial Cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 11, p. 4130–4136, 2008.

SEIDLER, M.; SALVENMOSER, S.; MULLER, F.-M. In vitro effects of micafungin against *Candida* biofilms on polystyrene and central venous catheter sections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 28, p. 568–573, 2006.

SHAH, M. S. et al. Quinoline containing chalcone derivatives as cholinesterase inhibitors and their in silico modeling studies. **Computational Biology and Chemistry**, v. 76, p. 310–317, 2018.

SHAMALI, N. et al. In vitro photodynamic inactivation (PDI) of pathogenic germs inducing onychomycosis. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 24, n. August, p. 358–365, 2018.

SHEN, H. et al. Recent Advances in Three-Dimensional Multicellular Spheroid Culture and Future Development. **micromachines**, v. 12, n. 96, p. 1–21, 2021.

SHIBU, E. S. et al. Nanomaterials formulations for photothermal and photodynamic therapy of cancer. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 15, n. 1, p. 53–72, 2013.

SHIRAKI, Y. et al. Cytokine secretion profiles of human keratinocytes during *Trichophyton tonsurans* and *Arthroderma benhamiae* infections. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 9, p. 1175–1185,

2006.

SILVA-ROCHA, W. P.; AZEVEDO, M. F. DE; CHAVES, G. M. Epidemiology and fungal species distribution of superficial mycoses in Northeast Brazil. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 27, n. 1, p. 57–64, 2017.

SILVA, L. et al. Repeated applications of photodynamic therapy on *Candida glabrata* biofilms formed in acrylic resin polymerized. **Lasers Medic Sci**, v. 32, p. 549–555, 2017.

SINGH, A. et al. High terbinafine resistance in *Trichophyton interdigitale* isolates in Delhi, India harbouring mutations in the squalene epoxidase gene. **Mycoses**, v. 61, n. 7, p. 477–484, 2018a.

SINGH, G. et al. A strategic approach to the synthesis of ferrocene appended chalcone linked triazole allied organosilatrane: Antibacterial, Antifungal, Antiparasitic and Antioxidant studies. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 2018b.

SINGKUM, P. et al. A Powerful in Vivo Alternative Model in Scientific Research : *Galleria Mellonella*. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 66, n. 1, p. 31–55, 2019.

SINGULANI, J. D. L. et al. Activity of gallic acid and its ester derivatives in *Caenorhabditis elegans* and zebrafish (*Danio rerio*) models. **Future Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 144, p. 1863–1872, 2017.

SINGULANI, J. DE L. et al. Antifungal Activity, Toxicity, and Membranolytic Action of a Mastoparan Analog Peptide. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. 419, p. 1–11, 2019.

SOARES, L. A. et al. Anti- *Trichophyton* activity of protocatechuates and their synergism with fluconazole. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1–9, 2014.

SOLL, D. R.; DANIELS, K. J. Plasticity of *Candida albicans* Biofilms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 3, p. 565–595, 2016.

SONG, K. et al. Three-dimensional dynamic fabrication of engineered cartilage based on chitosan / gelatin hybrid hydrogel scaffold in a spinner flask with a special designed steel frame. **Materials Science & Engineering C**, v. 55, p. 384–392, 2015.

SPIVAK, E. S.; HANSON, E. *Candida auris* : an Emerging Fungal Pathogen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 1–10, 2018.

STEPANOVIC, S. et al. A modified microtiter - plate test for quantification of staphylococcal biofilm

formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, p. 175–179, 2000.

STIEFEL, P. et al. Is biofilm removal properly assessed? Comparison of different quantification methods in a 96-well plate system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 9, p. 4135–4145, 2016.

SUDMAN, SCHMITT, J. A. Differentiation of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* by Pigment Production '. **Applied Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 290, 1965.

SULLIVAN, D. J. et al. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. **Microbiology**, v. 141, p. 1507–1521, 1995.

SUN, K. et al. In Vivo Evaluation of *Galla chinensis* Solution in the Topical Treatment of Dermatophytosis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1–7, 2017.

TAJUDDEEN, N. et al. The chemotherapeutic potential of chalcones against leishmaniasis: a review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 3, p. 311–318, 2018.

TAMURA, T. et al. In vitro susceptibility of dermatomycoses agents to six antifungal drugs and evaluation by fractional inhibitory concentration index of combined effects of amorolfine and itraconazole in dermatophytes. **Microbiology and Immunology**, v. 58, n. 1, p. 1–8, 2014.

TAN, Y. et al. Inhibitory effect of probiotic lactobacilli supernatants on single and mixed non- albicans *Candida* species biofilm. **Archives of Oral Biology**, v. 85, p. 40–45, 2018.

TANNENBAUM, J.; BENNETT, B. T. Russell and Burch ' s 3Rs Then and Now : The Need for Clarity in Definition and Purpose. **Journal of American Association for Laboratory Animal Science**, v. 54, n. 2, 2015.

TAVARES, L. D. C. et al. Quinoliny and quinoliny N-oxide chalcones: Synthesis, antifungal and cytotoxic activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 4448–4456, 2011.

TÓTH, Z. et al. Relative frequency of paradoxical growth and trailing effect with caspofungin, micafungin, anidulafungin, and the novel echinocandin rezafungin against candida species. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 136, p. 1–9, 2020.

TOUKABRI, N. et al. In vitro biofilms and antifungal susceptibility of dermatophyte and non-

dermatophyte moulds involved in foot mycosis. **Mycoses**, v. 61, n. 2, p. 79–87, 2018.

TRONO, J. D. et al. Size , Concentration and Incubation Time Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Pancreas Cancer Cells and its Future Application to X-ray Drug Delivery System. **Journal of Radiation Research**, v. 52, n. 1, p. 103–109, 2011.

TSAI, C. J.; LOH, J. M. S.; PROFT, T. Galleria mellonella infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 214–229, 2016.

VEASEY, J. V. et al. Epidemiological profile of tinea capitis in São Paulo City. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 92, n. 2, p. 283–284, 2017.

VERMOUT, S. et al. Pathogenesis of Dermatophytosis. **Mycopathologia**, v. 166, p. 267–275, 2008.

VILA, T. et al. Fungal Biofilms. **Reference Module in Life Sciences**, p. 1–7, 2017.

VILJOEN, B. C.; KOCK, J. L. F. The Genus Candida Berkhout nom . conserve- A Historical Account of its Delimitation. **Systematic and applied microbiology**, v. 12, n. 2, p. 183–190, 1989.

WAGENER, J.; LOIKO, V. Recent insights into the paradoxical effect of echinocandins. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 5, p. 1–10, 2018.

WEERASEKERA, M. M. et al. Culture media profoundly affect Candida Albicans and Candida tropicalis growth, adhesion and biofilm development. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 11, p. 697–702, 2016.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R. C. The dermatophytes. **Clinical microbiology reviews**, v. 8, n. 2, p. 240–59, 1995.

WINTERBOURN, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nature Chemical Biology**, v. 4, n. 5, p. 278–286, 2008.

XIAO, J. et al. Monitoring of Cell Viability and Proliferation in Hydrogel-Encapsulated System by Resazurin Assay. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 162, p. 1996–2007, 2010.

XU, K. et al. Activity of coumarin against Candida albicans biofilms. **Journal de Mycologie Medicale**, 2018.

XU, Z. et al. Crystal Violet and XTT Assays on Staphylococcus aureus Biofilm Quantification. **Current**

Microbiology, v. 73, n. 4, p. 474–482, 2016.

YANG, Y. et al. Biodegradable Polymer Nanoparticles for Photodynamic Therapy by Bioluminescence Resonance Energy Transfer. **Biomacromolecules**, p. A-G, 2017.

YENİŞEHİRLİ, G. et al. In vitro activities of antifungal drugs against dermatophytes isolated in Tokat, Turkey. **International Journal of Dermatology**, v. 52, n. 12, p. 1557–1560, 2013.

YOO, J.; HA, K. **New Insights into the Mechanisms for Photodynamic Therapy-Induced Cancer Cell Death**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2012. v. 295

YUAN, Y. et al. Photodynamic antimicrobial chemotherapy with the novel amino acid-porphyrin conjugate 4I : In vitro and in vivo studies. **plos one**, p. 1–20, 2017.

ZHAN, P.; LIU, W. The Changing Face of Dermatophytic Infections Worldwide. **Mycopathologia**, v. 182, n. 1–2, p. 77–86, 2017.

ZHANG, J. et al. Tacrolimus, not triamcinolone acetonide, interacts synergistically with itraconazole, terbinafine, bifonazole, and amorolfine against clinical dermatophyte isolates. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 28, n. 4, p. 612–616, 2018a.

ZHANG, J. et al. An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 8, n. 2, p. 137–146, 2018b.

ZHANG, X. et al. Multi-targetable chalcone analogs to treat deadly Alzheimer's disease: Current view and upcoming advice. **Bioorganic Chemistry**, v. 80, n. May, p. 86–93, 2018c.

ZHONG, Z. et al. Typing of Common Dermatophytes by Random Amplification of Polymorphic DNA. **Japanese Journal of Medical Mycology**, v. 38, n. 3, p. 239–246, 1997.

ZHOU, B.; XING, C. Diverse Molecular Targets for Chalcones With Varied Bioactivities. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 5, n. 8, p. 388–404, 2015.

ZHUANG, C. et al. HHS Public Access. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2018.

ZIDA, A. et al. GENERAL REVIEW / REVUE GE Anti- Candida albicans natural products , sources of new antifungal drugs : A review. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 27, n. 1, p. 1–19, 2016.