

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 26/02/2018.



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



CAROLINE BARCELOS COSTA ORLANDI

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

Araraquara
2016

CAROLINE BARCELOS COSTA ORLANDI

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

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

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

Araraquara
2016

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

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

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

Orientador: Maria José Soares Mendes Giannini

Orientador no exterior: Joshua Daniel Nosanchuk

Coorientador: Ana Marisa Fusco Almeida

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

CAPES: 40300005

CAROLINE BARCELOS COSTA ORLANDI

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

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

Aprovada em 26 / 02 / 2016

BANCA EXAMINADORA

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

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

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

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

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(Albert Einstein)

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

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

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

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

LISTA DE TABELAS

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

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC – *American Type Culture Collection*

BHI – *Brain Heart Infusion*

BLASTn - *Basic Local Alignment Search Tool*

CFM – Concentração fungicida mínima

CIF - Concentração inibitória fracionada

CIM – Concentração inibitória mínima

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CN – Controle negativo

CO₂. – Gás cabônico

ConA/CAAF - Concanavalina A

CP – Controle positivo

CTAB - Brometo de cetiltrimetilamônio

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's médium*

DTH – Hipersensibilidade do tipo tardia

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP's - Desoxirribonucleotídeos fosfatados

DO – Densidade óptica

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial

FDA - *Food and Drug Administration*

h – Hora

HaCat - Queratinócitos de pele humana

HCl – Ácido clorídrico

HepG2 - Células de hepatoma humano

hrs – Horas

IC₅₀ - Concentração onde ocorre 50% de morte celular

ICIF – Índice de concentração inibitória fracionada

ID – Identidade

iNOS – Óxido nítrico sintase induzida

IS - Índice de seletividade

ITS – *Internal Transcribed spacer*

L- Litro

Mc – *Microsporum canis*

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

Mg – *M. gypseum*

mg – Miligramas

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

mL - Mililitros

mM – Milimolar

MOPS - Ácido 3-(N-morfolina) propanossulfônico

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

mtDNA – DNA mitocondrial

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

NaCl – Cloreto de sódio

NaOAc - Acetato de sódio

NHOK - Queratinócitos normais de mucosa oral humana

nm – Nanômetros

NO – Óxido nítrico

NO₃⁻ - Nitrito

NO-np – Nanopartícula de óxido nítrico

NP – Nanopartícula

NTS – *Nontranscribed spacer*

°C – Graus Celsius

PBS – *Phosphate buffered saline*

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pH – Potencial de hidrogênio

RAPD - *Randomly amplified polymorphic DNA*

rDNA – DNA ribossomal

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RNA - Ácido ribonucleico

RNOS - Espécies reativas de óxido de nitrogênio

ROS – Espécies reativas de oxigênio

rpm – Rotações por minuto

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*

rRNA – RNA ribossomal

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SSU 1 – Gene codificante da bomba de efluxo de sulfito

TAE - Tris-Acetato-EDTA

Tm – *T. mentagrophytes*

TMOS – Tetrametilortosilano

Tr – *Trichophyton rubrum*

TRS – Elementos repetitivos interespersados

UFC – Unidades formadoras de colônia

UV – Ultravioleta

VERO – Células de rim de macaco verde da África

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

µg – Microgramas

µL – Microlitros

SUMÁRIO

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

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

4.3. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO DA SULFORODAMINA B.....	84
4.4. ENSAIO DE FORMAÇÃO DO BIOFILME	90
4.4.1. Análise morfológica dos biofilmes	90
4.4.2. Determinação da atividade metabólica do biofilme pelo ensaio de redução do XTT	91
4.4.3. Quantificação do biofilme	94
4.4.3.1. Quantificação da massa do biofilme por coloração com cristal violeta	94
4.4.3.2. Quantificação da matriz extracelular e estruturas polissacarídicas pela coloração com safranina.	97
4.4.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	100
4.4.5. Microscopia confocal de varredura a laser.....	113
4.4.6. Efeito dos fármacos antifúngicos e dos derivados do ácido protocatecuico nas células planctônicas	119
4.4.7. Efeito dos fármacos antifúngicos e do derivado do ácido protocatecuico frente aos biofilmes pré-formados de dermatófitos	124
4.4.8. Comparação entre as células planctônicas e em formato biofilme quanto à sensibilidade aos fármacos antifúngicos e ao derivado do ácido protocatecuico	129
4.4.9. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biofilmes tratados	135
4.4.10. Microscopia confocal de varredura a laser dos biofilmes pré-formados tratados	147
4.5. ATIVIDADE <i>in vitro</i> DA COMBINAÇÃO ENTRE TERBINAFINA E O PROTOCATECUATO DE NONILA CONTRA <i>T. rubrum</i> e <i>T. mentagrophytes</i>	152
 Parte II: Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antifúngica de nanopartículas de óxido nítrico e do efinaconazol (Jublia®) contra células planctônicas e biofilmes de <i>T. rubrum</i>.	155
 5. OBJETIVOS	157
5.1. OBJETIVO GERAL.....	157
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	157
6. MATERIAL E MÉTODOS	159
6.1. AMOSTRAGEM.....	159
6.2. CULTIVO.....	159
6.3. OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO NÍTRICO (NO-np).....	159
6.4. AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE <i>T. rubrum</i> AOS ANTIFÚNGICOS E ÀS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO NÍTRICO PELA TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO.....	160
6.4.1. Diluição dos fármacos	160

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

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

Capítulo I

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. REVISÃO HISTÓRICA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1. Dermatofitoses

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

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

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

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

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

1.2.2. Patogenia e fatores de virulência

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2.3. Epidemiologia

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

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

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

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

1.2.4. Diagnóstico

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

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

1.2.4.1. Método convencional

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

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

1.2.4.2. Método molecular

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

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

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

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

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

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

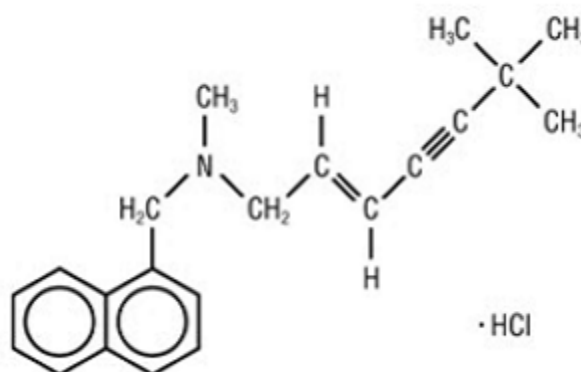
1.2.5. Tratamento

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

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

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

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



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

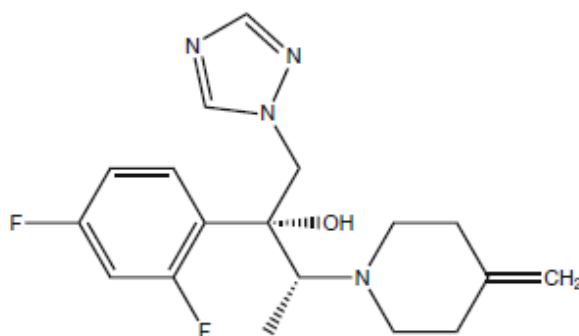
O uso desses medicamentos deve ser feito com cautela e supervisão, devido ao aumento da resistência dos fungos aos antifúngicos, além do risco de interações com outros fármacos. Além disso, muitos desses medicamentos são tóxicos para as nossas células, uma vez que seus alvos celulares são limitados pela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

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

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

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

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



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

1.2.6. Biofilmes

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

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

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

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

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

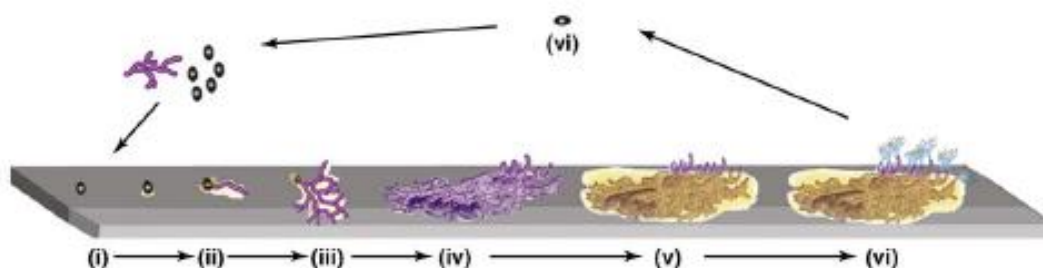
Embora sejam poucos os relatos na literatura sobre e a utilização da palavra “biofilme” quando se trata dos fungos filamentosos, muitas são as evidências indicativas de formação de

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

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

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

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



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

1.2.7. Ácido protocatecuico

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

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

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

1.2.8. Nanopartículas de óxido nítrico (NO-np)

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

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

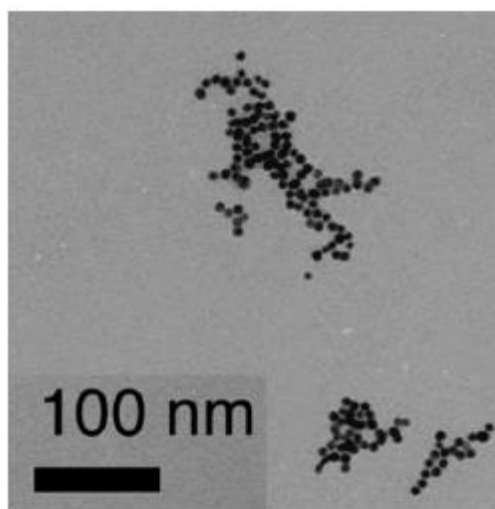
Dependendo da sua concentração, o óxido nítrico exerce efeito antimicrobiano de duas maneiras: em concentrações baixas, o NO age como molécula sinalizadora que promove o crescimento e a atividade de células do sistema imune e, em concentrações altas (acima de 1 μ M), as moléculas de NO se ligam covalentemente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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

Conclusões

(Partes I e II)

8. CONCLUSÕES

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

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

Referências Bibliográficas

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-RAHMAN, S. M. Strain differentiation of dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 319-33, 2008 Nov-Dec 2008.
- ACHTERMAN, R. R.; WHITE, T. C. A foot in the door for dermatophyte research. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 3, p. e1002564, 2012.
- _____. Dermatophyte Virulence Factors: Identifying and analyzing genes that may contribute to chronic or acute skin infections **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 1-8, 2012.
- AJELLO, L. Natural history of the dermatophytes and related fungi. **Mycopathol Mycol Appl**, v. 53, n. 1, p. 93-110, Aug 30 1974.
- AJESH, K.; SREEJITH, K. *Cryptococcus laurentii* biofilms: structure, development and antifungal drug resistance. **Mycopathologia**, v. 174, n. 5-6, p. 409-19, Dec 2012.
- ALBUQUERQUE P. C., NAKAYASU E. S., RODRIGUES M. L., FRASES S., CASADEVALL A., ZANCOPE-OLIVEIRA R. M., ALMEIDA I. C., NOSANCHUK J. D. Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. **Cell Microbiol**. v. 10 n.8, p. 1695-710, 2008.
- ALTSCHUL S. F., GISH W., MILLER W., MYERS E. W., LIPMAN D. J. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**, v. 215, n. 3, p. 403-10, 1990.
- AQUINO, V. R.; CONSTANTE, C. C.; BAKOS, L. Frequency of dermatophytosis in mycological examinations at a general hospital in Porto Alegre, Brazil **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 3, p. 239-244, 2007.
- ARAUJO R. C., NEVES F. A., FORMAGIO A. S., KASSUYA C. A., STEFANELLO M. E., SOUZA V. V., PAVAN F. R., CRODA J. Evaluation of the anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity and *in vivo* acute toxicity of *Annona sylvatic*. **BMC Complement Altern Med**. v. 14, p. 209, 2014.
- ARAÚJO S. M., FONTES C. J., LEITE JÚNIOR D. P., HAHN R. C. Fungal agents in different anatomical sites in Public Health Services in Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. v. 54, n. 1, p. 5-10, Jan-Feb 2012.
- ARAÚJO, S. A. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; DANTAS, V. M.; MIRANDA, A. M.; LIMA, F. E. S.; MELO, V. S. P.; RICARTE, A. R. F.; COSTA, E. C. Avaliação *in vitro* da atividade citotóxica de drogas antivirais em fibroblastos caprinos. **Ciência Animal**, v. 18, n. 1, p. 25-31, 2008.
- BAEZA, L. C.; GIANNINI, M. J. Strain differentiation of *Trichophyton rubrum* by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 46, n. 6, p. 339-41, 2004 Nov-Dec 2004.
- BAEZA, L. C.; MATSUMOTO, M. T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Strain differentiation of *Trichophyton rubrum* by randomly amplified polymorphic DNA and analysis of rDNA nontranscribed spacer. **J Med Microbiol**, v. 55, n. Pt 4, p. 429-36, Apr 2006.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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