



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Thiago Henrique Lemes

Estudo de antagonismo fúngico de extratos de culturas de *Candida* spp. e *Trichophyton* spp. contra agentes de onicomicoses

São José do Rio Preto
2023

Thiago Henrique Lemes

Estudo de antagonismo fúngico de extratos de culturas de *Candida* spp. e *Trichophyton* spp. contra agentes de onicomicoses

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação de Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof.^a Dr.^a Margarete Teresa
Gottardo de Almeida

São José do Rio Preto
2023

L552e

Lemes, Thiago Henrique

Estudo de antagonismo fúngico de extratos de culturas de *Candida* spp. e *Trichophyton* spp. contra agentes de onicomicoses / Thiago Henrique Lemes. -- São José do Rio Preto, 2023

122 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Margarete Teresa Gottardo de Almeida

1. Microbiologia. 2. Micologia. 3. Dermatofitos. 4. *Candida*. 5. Micoses. I. Título.

Thiago Henrique Lemes

Estudo de antagonismo fúngico de extratos de culturas de *Candida* spp. e *Trichophyton* spp. contra agentes de onicomicoses

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação de Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof.^a Dr.^a Margarete Teresa Gottardo de Almeida
FAMERP – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.
Orientadora.

Prof. Dr. João Roberto Antonio
FAMERP – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

Prof.^a Dr.^a Maria Lúcia Scroferneker
UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Prof.^a Dr.^a Cátia Rezende
UNIFEV – Centro Universitário de Votuporanga.

Prof.^a Dr.^a Lilian Cristiane Baeza
UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

São José do Rio Preto
22 de junho de 2023

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, gratidão por todas as conquistas, ingresso e conclusão deste trabalho, por me abençoar grandemente e me conceder o privilégio da vida. Por me cercar de pessoas maravilhosas que me ensinam muito todos os dias.

À minha tia Rozanda Parro Rodrigues, por simplesmente existir, por ser minha mãe, por todo o ensinamento e embasamento dado. Por todo amor, carinho, dedicação. Pelas horas não dormidas nos momentos de doença, pelo suporte financeiro resultando em várias horas extras de trabalho e muito cansaço, para tornar possível a realização desse projeto. Palavras não serão suficientes para expressar o quanto sou grato por essa mãe maravilhosa no qual sou extremamente abençoado em ter. Muito obrigado, você é minha inspiração.

Às minhas avós (*in memoriam*) Otaira Rosa Parro e Inês da Silva Lemes, vocês fazem muita falta, obrigado por todo o ensinamento e amor depositado em mim, vocês são mulheres excepcionais, uma grande inspiração.

Aos meus pais Rosângela Maria Parro e José Roberto Jacinto Lemes por todo carinho e apoio no decorrer da minha vida, por me ensinar todos os valores importantes contribuindo para a pessoa que sou hoje.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Margarete Teresa Gottardo de Almeida, pela oportunidade e confiança na minha capacidade para a realização desse projeto. Agradeço pelo ensino, paciência, dedicação, carinho e disponibilidade. Também pelo auxílio nas horas mais difíceis contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional. Meus mais profundos e sinceros agradecimentos.

À Prof.^a Dr.^a Elza Maria Castilho, pelo acolhimento, carinho e ajuda. Eternamente grato por todo auxílio dado no decorrer desse projeto. Muito obrigado.

À Luceli Ferreira de Souza por todo o auxílio e companheirismo para com esse projeto. Pela paciência em ensinar. Sua atenção e dedicação foram fundamentais para a realização dessa pesquisa. Pessoa excepcional.

Aos meus amigos de laboratório Natalia Seron, Bianca Gottardo, Taiza Maschio, Cleuzenir Toschi Gomes Barbieri, Veridianna Pattini, Cleiriane Lúcia, Marcos Garcia, Letícia Mozanner pelo companheirismo, ajuda e auxílio na realização do projeto. Obrigado pelos ótimos momentos de descontração durante todo esse tempo.

À Maicon Henrique Caetano e Emília Cristina Gianizella, dois grandes amigos, irmãos, parceiros, formando um trio de cumplicidade nunca visto. Agradeço a amizade de vocês, os conselhos, conversas e ótimos momentos juntos.

À Felipe Lopes Cardozo pelo companheirismo nas horas difíceis de incertezas e ansiedade, por ouvir horas e horas de treinos de aulas sobre assuntos diversos e fora de sua área de conhecimento. Um privilégio ter sua companhia.

Ao Prof. Dr. Luis Octávio Regasini e Julyanna Andrade Silva Nascente pela realização e ajuda com as análises químicas. Obrigado pelo tempo de ensino e experiência.

Ao Prof. Dr. Valeriano Antonio Corbellini do Departamento de Ciências, Humanidades e Educação da Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, pela realização de análise do perfil químico dos extratos.

Aos professores Dr.^a Mariela Domiciano Ribeiro e Dr.^a Márcia Maria Costa Nunes Soares por participarem da banca examinadora de qualificação, contribuindo para o enriquecimento científico do projeto.

Aos membros da comissão examinadora deste trabalho, Prof. Dr. João Roberto Antônio, Prof.^a Dr.^a Maria Lúcia Scroferneker, Prof.^a Dr.^a Cátia Rezende e Dr. João Paulo Zen Siqueira, pelo aceite do convite e por disponibilizarem tempo na correção deste trabalho, agregando experiência e conhecimento ao mesmo.

Ao Laboratório de Microbiologia e à FAMERP, pela infraestrutura de ensino e pesquisa, essenciais para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, professores, coordenadores e equipe técnica, pela disponibilidade, dedicação aos alunos e prontidão em esclarecer todas as dúvidas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - 001, pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos os meus amigos, colegas e professores que não foram citados, mas que fizeram parte da minha formação e acreditaram em meu potencial.

RESUMO

Onicomicoses são infecções de unhas causadas principalmente por fungos dermatófitos, seguidos de leveduras e fungos filamentosos não dermatófitos (FFNDs). Caracterizam-se por condições clínicas persistentes, de terapêutica prolongada com altas taxas de recorrência, sendo as infecções mistas, responsáveis por quadros de recorrência e recalcitrância. Adicionalmente, o escasso arsenal antifúngico utilizado para o tratamento e a mudança no perfil de suscetibilidade dos agentes etiológicos tem contribuído para o difícil controle das onicomicoses. O presente estudo avaliou a atividade antifúngica dos extratos obtidos de culturas puras e mistas entre dermatófitos e *Candida parapsilosis* contra linhagens de *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes*. Foram realizados ensaios de toxicidade, *in vivo*, com *Galleria mellonella*, do efeito combinatório dos extratos com fármacos itraconazol, fluconazol e terbinafina, da cinética de morte com ensaio *Time kill*, investigação de ação dos extratos sobre parede ou membrana além da determinação do perfil químico dos extratos através da técnica de FTIR (infravermelho transformada de Fourier). O antagonismo foi determinado através dos ensaios de microdiluição com resultados de valores de concentração inibitória mínima (CIM) entre 250 e 8000 µg/mL contra as cepas de dermatófitos e leveduras. Na cinética de morte microbiana, as atividades dos extratos resultaram em dados de completa inibição de dermatófitos em 48 horas, comparando-se aos controles. O efeito combinatório dos extratos de cultura com os antifúngicos demonstrou sinergismo, com decréscimo nos valores de CIM: fluconazol de 2 para 0.25 µg/mL; itraconazol de 0.25 para 0.03 µg/mL; terbinafina de 0.01 para 0.002 µg/mL; e extratos de 4000 para 1.9 µg/mL. A estrutura alvo de ação dos extratos foi a membrana citoplasmática fúngica. Os ensaios de toxicidade dos extratos com *Galleria mellonella* foram negativos. Pode-se inferir que os extratos de cultura obtidos a partir de linhagens clínicas de *Candida parapsilosis* e dermatófitos, apresentam notáveis metabólitos bioativos atóxicos, capazes de inibir fungos patogênicos, abrindo novas perspectivas terapêuticas.

Palavras-chave: Onicomicoses. Antagonismo. Dermatófitos. *Candida* spp. Atividade Antifúngica.

ABSTRACT

Onychomycosis is a nail infection caused mainly by dermatophyte fungi, followed by yeasts and non-dermatophyte filamentous fungi (FFNDs). These infections are characterized by persistent clinical conditions, prolonged therapy with high recurrence rates, and mixed infections that are responsible for recalcitrance. Additionally, the scarce arsenal of antifungal therapies used for the treatment and the change in the susceptibility profile of the etiological agents have contributed to the complex control of onychomycosis. The present study evaluated the antifungal activity of extracts from pure and mixed cultures between dermatophytes and *Candida parapsilosis* against *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* strains. Toxicity assays, *in vivo*, with *Galleria mellonella*, the combinatorial effect of extracts with the drugs itraconazole, fluconazole, and terbinafine, the time of death with the Time kill assay, an investigation of the action of the extracts on the wall or membrane, in addition to determining the chemical profile using the FTIR technique (infrared Fourier transform), were performed. Antagonism was determined through microdilution assays with minimum inhibitory concentration (MIC) values between 250 and 8000 µg/mL against dermatophyte and yeast strains. In the kinetics of microbial death, the activities of the extracts resulted in data of complete inhibition of dermatophytes in 48 hours, compared to controls. The combinatorial effect of the culture extracts with the antifungals showed synergy, with a decrease in the MIC values: fluconazole from 2 to 0.25 µg/mL; itraconazole 0.25 to 0.003 µg/mL; terbinafine from 0.01 to 0.002 µg/mL; and extracts from 4000 to 1.9 µg/mL. The target structure of action was the fungal cell membrane. The toxicity tests of extracts with *Galleria mellonella* were negative. It can be inferred that the culture extracts obtained from clinical *Candida parapsilosis* and dermatophyte strains present remarkable non-toxic bioactive metabolites capable of inhibiting pathogenic fungi, opening new therapeutic perspectives.

Keywords: Onychomycosis. Antagonism. Dermatophytes. *Candida* spp. Antifungal activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estruturas do aparato ungueal em eixo plano (A) e sagital (B).	17
Figura 2 – Formas clínicas das onicomicoses: (A) descoloração, onicólise e hiperqueratose subungueal causada por OSDL; (B) OSP causando descoloração da placa ungueal proximal; (C) manchas opacas brancas da placa ungueal, caracterizando OSB e (D) ODT com placa ungueal quebradiça e totalmente invadida por fungo.	18
Figura 3 – Fluxograma dos estágios iniciais de infecção por dermatófitos, sinais positivos e negativos representam indução ou repressão, respectivamente.	20
Figura 4 – Manifestação clínica de onicomicose por <i>Candida</i> spp.	22
Figura 5 – Onicomicoses causadas por diferentes espécies de fungos filamentosos não dermatófitos.	23
Figura 6 – Diagnóstico laboratorial das onicomicoses.	24
Figura 7 – Obtenção dos extratos de culturas puras e mistas.	34
Figura 8 – Fluxograma para avaliação do efeito combinatório dos extratos com os fármacos fluconazol, itraconazol e terbinafina.	37
Figura 9 – Esquema de funcionamento de espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier.	40
Figura 10 – Espectros FTIR de alguns compostos padrões pertencentes a biblioteca do NIST da web: (A) 2-Feniletanol; (B) Farnesol; (C) Fenilacetaldeído; (D) Ácido Fenilacético; (E) Ácido indolacético; (F) Ácido oleico e (G) Benzoquinona.	43
Gráfico 1 – Representação gráfica da cinética de morte de TRCBS em contato com os extratos.	53
Gráfico 2 – Representação gráfica da cinética de morte de TR6185 em contato com os extratos.	53
Gráfico 3 – Representação gráfica da cinética de morte de TMatCC em contato com os extratos.	54

Gráfico 4 – Representação gráfica da cinética de morte de TM5094 em 54
contato com os extratos.

Gráfico 5 – Representação da sobrevivência (%) das larvas de *Galleria* 56
mellonella expostas aos extratos com monitoramento em intervalos de
24 horas durante um período de 5 dias.

Gráfico 6 – Espectros médios de reflexão total atenuada (ATR) de 57
extratos de amostras de caldos de cultura de *C. parapsilosis* e
Trichophyton spp. (A) espectros sobrepostos; (B) espectros
escalonados.

Gráfico 7 – Regiões amplificadas de espectros FTIR/ATR médios dos 58
extratos de culturas de *Candida parapsilosis* e *Trichophyton* spp.

Gráfico 8 – Gráficos CP1xCP2, CP1xCP3 e CP2xCP3 e respectivos 61
pesos das variáveis de três primeiras CPs, referente às triplicatas de
espectros FTIR/ATR, de extratos de cultura de *C. parapsilosis* e
Trichophyton spp.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atribuições das principais bandas de compostos orgânicos para FTIR/ATR na faixa de 4000 - 650 cm ⁻¹ .	41
Tabela 2 – Valores de Concentração Inibitória mínima (CIM) dos fármacos fluconazol, itraconazol e terbinafina contra as linhagens de dermatófitos.	45
Tabela 3 – Intervalo dos valores de Concentração Inibitória mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos extratos contra as linhagens de dermatófitos.	46
Tabela 4 – Média geométrica dos valores de CIM e CFM dos extratos frente as linhagens de dermatófitos.	47
Tabela 5 – Valores de concentração inibitória mínima (CIM) do fluconazol frente as espécies de Candida (CA: <i>C. albicans</i> ; CP: <i>C. parapsilosis</i> ; CAU: <i>C. auris</i>).	47
Tabela 6 – Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do extrato de <i>C. parapsilosis</i> contra <i>Candida</i> spp.	48
Tabela 7 – Média geométrica (MG) dos valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM).	48
Tabela 8 – Ensaio <i>Checkerboard</i> , redução nos valores de CIM.	50
Tabela 9 – Média geométrica dos ICIFs obtidos, efeito combinatório predominante sinérgico.	51
Tabela 10 – Média geométrica dos valores de CIM dos extratos e fármacos na presença ou ausência de sorbitol – ergosterol.	52
Tabela 11 – Número de UFC/mL das linhagens de dermatófitos em exposição a diferentes tempos aos extratos.	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABD	Agar Batata Dextrose
ASD	Agar Sabouraud Dextrose
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CBS	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i>
CEM	Concentração Efetiva Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standard Institute</i>
CS	Caldo Sabouraud Dextrose
FFNDs	Fungos Filamentosos não Dermatófitos
FTIR/ATR	Infravermelho transformada de Fourier de Reflexão Total Atenuada
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionada
M	Molar
mL	Mililitro
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
nm	Nanômetro
PM	Peso molecular
RPMI	<i>Rosen Park Memorial Institute</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
µg	Microgramas
µM	Micrometro

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Manifestações clínicas das onicomicoses	17
2.2 Epidemiologia e etiologia das onicomicoses	18
2.3 Onicomicoses causadas por dermatófitos.....	19
2.4 Onicomicoses causadas por <i>Candida</i> spp.	21
2.5 Onicomicoses causadas por fungos filamentosos não dermatófitos	22
2.6 Diagnóstico das onicomicoses	23
2.7 Tratamento das onicomicoses.....	26
2.8 Implicações clínicas em onicomicoses de etiologia mista	27
3 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	31
4 OBJETIVO	32
4.1 Objetivos específicos	32
5 METODOLOGIA	33
5.1 Linhagens fúngicas	33
5.2 Obtenção dos extratos de culturas puras e mistas.....	33
5.3 Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das linhagens de dermatófitos frente aos extratos e fármacos itraconazol, fluconazol e terbinafina.....	35
5.4 Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das linhagens de <i>Candida</i> spp. frente ao extrato de <i>Candida parapsilosis</i> e fluconazol.	35
5.5 Determinação da concentração fungicida mínima.....	36
5.6 Ensaio <i>checkerboard</i>	36
5.7 Ensaio com sorbitol e ergosterol	37
5.8 Ensaio de cinética de morte – <i>time kill</i>	38
5.9 Ensaio de toxicidade com <i>Galleria mellonella</i>	38
5.10 Determinação do perfil químico dos extratos por infravermelho transformada de fourier (FTIR).....	39
6 RESULTADOS.....	45
6.1 Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das linhagens de dermatófitos frente aos extratos e fármacos	45
6.2 Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das linhagens de <i>Candida</i> spp. frente ao fluconazol e extrato	47
6.3 Ensaio <i>Checkerboard</i>	49

6.4 Ensaio com sorbitol e ergosterol.	51
6.5 Ensaio de cinética de morte – <i>Time kill</i>	52
6.6 Ensaio de toxicidade com <i>Galleria mellonella</i>	55
6.7 Determinação do perfil químico dos extratos por infravermelho transformada de fourier	56
REFERÊNCIAS.....	63

CAPÍTULO 2

7 ARTIGO I 73

Combinatorial effect of fluconazole, itraconazole, and terbinafine with different culture extracts of *Candida parapsilosis* and *Trichophyton* spp. against *Trichophyton rubrum*

Abstract.	74
Introduction.....	75
Methods.....	75
Results.	77
Discussion.	78
References.	81

8 ARTIGO II 87

Candida parapsilosis culture extracts: *in vitro*, antagonistic action against *Candida albicans*, *Candida auris* e *Candida parapsilosis*

Abstract.	88
Introduction.....	89
Methods.....	89
Results.	91
Discussion and conclusion.	94
References.	96

9 ARTIGO III 99

Antagonistic interactions between etiological agents of onychomycosis: antifungal activity of extracts of pure and mixed cultures of *Candida* spp. and *Trichophyton* spp

Abstract.	100
Introduction.....	100
Methods.....	101

Results.	103
Discussion.	104
References	107

10 ARTIGO IV 118

Ação inibitória de metabólitos extraídos de cultura de *Candida parapsilosis* contra *Microsporum canis*

Introdução.	119
Objetivo.	119
Metodologia.....	119
Resultados.	120
Conclusão.	120

CAPÍTULO 3

11 CONCLUSÃO 122

1 INTRODUÇÃO

Onicomicoses são infecções de unha, de incidência mundial, que afetam o aparato ungueal, causadas por fungos dermatófitos, leveduras e fungos filamentosos não dermatófitos (FFNDs). Caracterizam-se clinicamente por descolamento, descoloração, hiperqueratose e onicólise do leito ungueal (LEUNG et al., 2019). Fatores como localização geográfica, condições climáticas, estilo de vida ou doenças crônicas do hospedeiro influenciam as taxas de incidência (SIGURGEIRSSON; BARAN, 2014; BEUSCHER; KELECHI, 2019).

Os dermatófitos correspondem a 70% dos casos de onicomicoses e são fungos altamente especializados, quanto à capacidade de degradação de tecidos queratinizados como pele, cabelos e unhas. Dentre os grupos prevalentes, a espécie *Trichophyton rubrum* é a mais isolada, seguida por complexo *T. mentagrophytes* (GUPTA et al., 2020a) e, *Epidermophyton floccosum*. No entanto, diversos estudos demonstram incidências variáveis quanto à etiologia por leveduras, incluindo o gênero *Candida*, com espécies *C. albicans* e *C. parapsilosis*, além de, outros filamentosos como *Scopulariopsis brevicaulis*, *Acremonium* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Neoscytalidium* (ANDRES, ALEXANDRO, 2020; RATHER et al., 2021; GUPTA et al., 2020b), de ocorrência única ou mista (TAMER, YUKSEL, 2019).

O escasso arsenal antifúngico disponível para o tratamento das onicomicoses e o surgimento de linhagens resistentes a terapia antifúngica contribui para a sua natureza recorrente e recalcitrante (GAURAV et al., 2021; GUPTA et al., 2019).

Considerando o exposto acima, e o aumento de infecções mistas por diversas espécies de fungos, o conhecimento das interações competitivas entre os microrganismos, com produção de metabólitos de interferência sobre morfogênese, esporulação e crescimento, constitui-se como novo desafio (LEMES et al., 2021a; TIAN et al., 2021). Tem-se novo cenário de novas abordagens terapêuticas para o tratamento das onicomicoses.

2 REVISÃO DE LITERATURA

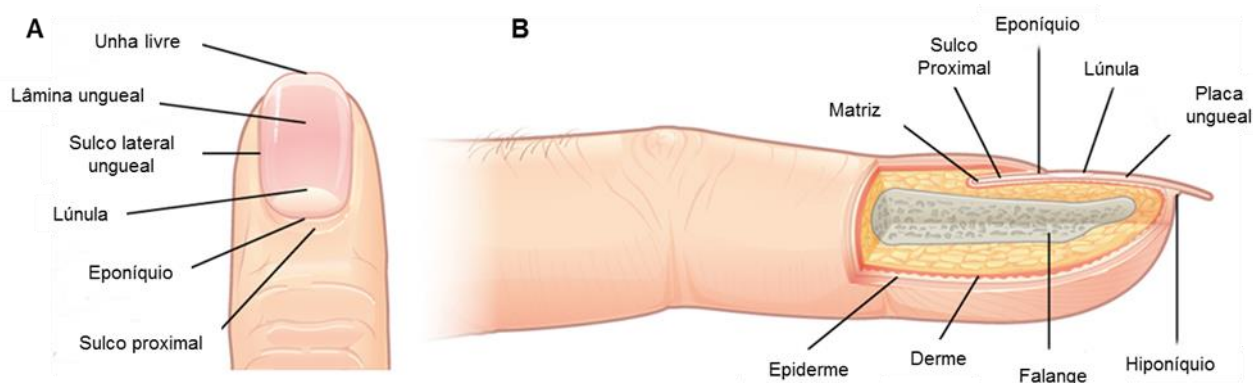
2.1 Manifestações clínicas das onicomicoses.

As onicomicoses são infecções que afetam todo o aparato ungueal, um importante componente com principal função de proteção, além de inclusão ao valor estético. O aparato ungueal é formado principalmente por lâmina ungueal, sulcos periungueais, eponíquio, matriz, hiponíquio, leito ungueal e banda onicodermal (Figura 1) (DE BERKER, 2013).

Os componentes da lâmina ungueal consistem em moléculas de queratina, uma estrutura proteica fibrosa, com alta proporção de aminoácido cisteína, rico em enxofre, e em menor proporção, aminoácidos como metionina, tirosina, lisina e histidina. O alto teor de ligações dissulfeto confere a essa estrutura a característica de resistência e propriedade de barreira semipermeável (GONZÁLEZ-SERVA, 2018; SAEEDI; SHAVANDI; MEREDITH-JONES, 2018).

Toda estrutura pode sofrer interferência quando afetada por microrganismos e, na presença de fungos, expressar características comuns como rugosidade, espessamento, corrosão, rachaduras, discromia e destruição da placa ungueal (PIRACCINI; ALESSANDRINI, 2015).

Figura 1. Estruturas do aparato ungueal em eixo plano (A) e sagital (B).



Fonte: (DE BERKER, 2013), adaptado.

Devido às diferentes formas clínicas de manifestação, as onicomicoses são classificadas em: Subungueal Distal e Lateral (OSDL); Subungueal Proximal (OSP); Superficial Branca (OSB) e Distrófica Total (ODT). Para essa classificação são

considerados critérios como localização, extensão do comprometimento e coloração das unhas (Figura 2) (LIPNER; SCHER et al., 2019).

Figura 2: Formas clínicas das onicomicoses: (A) descoloração, onicólise e hiperqueratose subungueal causada por OSDL; (B) OSP causando descoloração da placa ungueal proximal; (C) manchas opacas brancas da placa ungueal, caracterizando OSB e (D) ODT com placa ungueal quebradiça e totalmente invadida por fungo.



Fonte: (PIRACCINI; ALESSANDRINI, 2015) modificado.

2.2 Epidemiologia e etiologia das onicomicoses

A epidemiologia das onicomicoses está diretamente relacionada a fatores ambientais, aos patógenos e ao hospedeiro. A urbanização, industrialização, localização geográfica e condições climáticas englobam o grupo de fatores ambientais, justamente pela característica cosmopolita ou de adaptação ao meio desses microrganismos (GUPTA et al., 2017). Os fatores ligados ao hospedeiro são representados por estilo de vida, ocupação, sexo e doenças crônicas. Ressalta-se que a incidência na população em idade acima dos 60 anos é superior a 40%, fato diretamente ligado a baixa imunidade, doenças vasculares periféricas ou metabólicas (BODMAN, KRISHNAMURTHY, 2022; LEUNG et al., 2019).

As onicomicoses correspondem a 50% de todas as infecções de unhas com um impacto de 5% a 20% da população mundial, nos últimos anos, em crescente aumento (GUPTA et al., 2020a).

Na Europa, as taxas de ocorrência apresentam variações de 4,3% a 29,6%, nos estudos de base populacional e, 8,9% nos de base hospitalar. Um levantamento realizado por Gregoriu e colaboradores, demonstrou com 3.226 pacientes, uma incidência de onicomicoses em 27,9% dos pacientes, sendo a população masculina a

de maior índice de acometimento (40,04%), contra a feminina (23%) (GREGORIOU et al., 2020). Em uma pesquisa com mais de 96.000 pacientes em 20 países europeus, a onicomicose também foi diagnosticada em 29,6% da população. Na América do Norte os índices de acometimento variam entre 9% a 14% (LIPNER et al., 2021; SIGURGEIRSSON; BARAN, 2014).

Fatores predisponentes incluem ocorrência simultânea de infecção fúngica em outras partes do corpo (*tinea pedis* em especial), uso de sapatos oclusivos e apertados, hiperidrose, trauma nas unhas, limpeza inadequada das unhas, uso de piscinas, banhos comunitários, fatores genéticos, imunodeficiência, diabetes *mellitus*, obesidade, tabagismo, doença vascular periférica, insuficiência venosa, hálux valgo e síndrome da unidade ungueal da marcha assimétrica (PHAITONWATTANAKIJ et al., 2021).

Considerando o gênero, onicomicose nas unhas dos pés é mais comum em homens tendo dermatófitos como grupo prevalente, enquanto nas unhas das mãos, é mais comum em mulheres, causadas por espécies de *Candida* (BODMAN, KRISHNAMURTHY, 2022).

Nos países ocidentais, onicomicoses são causadas predominantemente por dermatófitos, com frequência entre 50 - 72% dos casos, as leveduras responsáveis por até 20%, enquanto os FFNDs, até 10% dos casos (GUPTA et al., 2020b).

2.3 Onicomicoses causadas por dermatófitos

Onicomicoses causadas por fungos dermatófitos, denominadas *tinea ungueum*, correspondem a 90% de todas as infecções de unha dos pés e 50% de unha das mãos (BABAYANI et al., 2018).

Os dermatófitos são fungos cosmopolitas e queratinofílicos com inclusão de nove gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*, *Arthroderma*, *Nannizzia*, *Ctenomyces*, *Lophophyton*, *Guarromyces* e *Paraphyto*. De acordo com seu habitat primário recebem classificação como zoofílicos, antropofílicos e geofílicos, constituindo elevada ocorrência entre humanos, as espécies antropofílicas e zoofílicas (GUPTA et al., 2022).

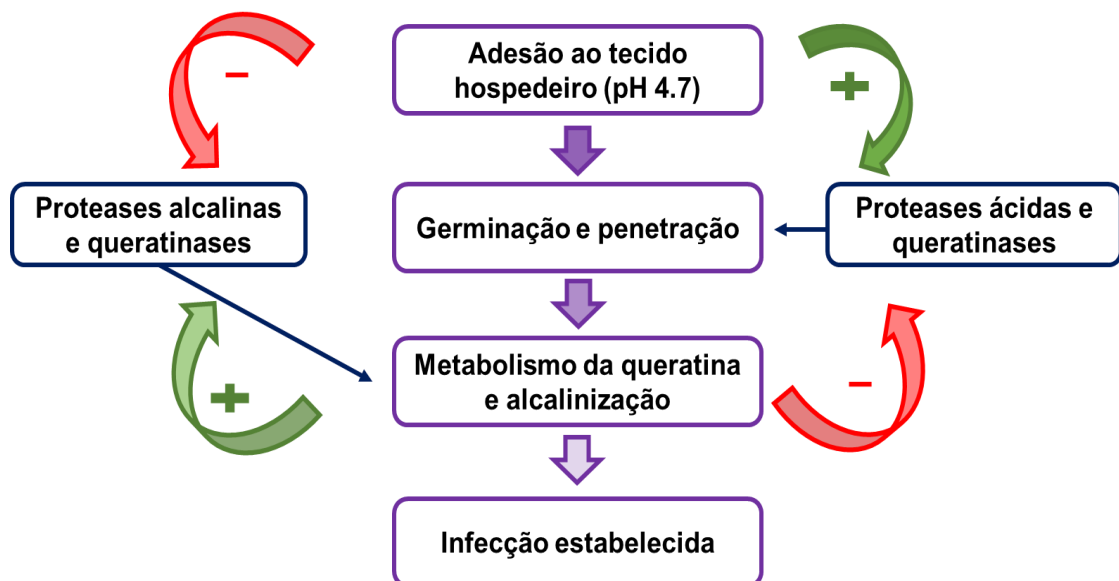
Destacam-se as espécies *Trichophyton rubrum* e o complexo *T. mentagrophytes* como os principais agentes etiológicos desse grupo, seguidos por *Epidermophyton floccosum* e *Microsporum canis* (MONOD, MÉHUL, 2019; APPELT et al., 2021). No

Brasil, dados epidemiológicos mostram maior incidência de infecções causadas por *T. rubrum* nas regiões Sul e Sudeste, seguido por *M. canis* e *T. mentagrophytes*. Por outro lado, na região Nordeste, é observada maior prevalência de *T. tonsurans*, ao lado de *T. rubrum* e *M. canis* (PETRUCELLI et al., 2020)

Durante o processo infeccioso diversos fatores de virulência são produzidos como enzimas hidrolíticas que possibilitam a degradação da queratina; alterações metabólicas determinantes para utilização de nutrientes do tecido hospedeiro; adaptação ao pH com fatores de transcrição que regulam a adaptação fúngica ao estresse; e vesículas extracelulares que modulam a resposta imune do hospedeiro (SARDANA, GUPTA, MATHACHAN, 2021).

Mecanismos complexos de sinalização intracelular são ativados para o processo de adesão, penetração e manutenção dos dermatófitos no tecido. A primeira interação com o pH ácido (4,7) do tecido hospedeiro desencadeiam a expressão de genes que codificam proteases, lipases, adesinas com atividade ótima em pH ácido. Devido a proteínas de degradação e metabolismo como glicina e acetato, uma mudança dependente de fonte de carbono para pH alcalino é realizada. Esses mecanismos garantem o estabelecimento da infecção (Figura 3) (MARTINEZ-ROSSI et al., 2021).

Figura 3. Fluxograma dos estágios iniciais de infecção por dermatófitos, sinais positivos e negativos representam indução ou repressão, respectivamente.



Fonte: (MARTINEZ-ROSSI et al., 2021), adaptado.

2.4 Onicomicoses causadas por *Candida* spp.

Recente estudo aponta uma alta prevalência de onicomicoses causadas por *Candida* spp. com taxas de alcance entre 24 a 45% (SHEMER et al., 2020). A espécie *C. albicans*, por anos, perdurou como principal agente etiológico de infecções das unhas, entretanto *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* têm emergido e superado em número, como agente causais de onicomiose. Embora de menor ocorrência, outras espécies como *C. guilliermondii*, *C. glabrata* e *C. krusei*, são importantes agentes microbianos, dada à resistência aos antifúngicos (FICH et al., 2019; GE et al., 2019; PAŠKEVIČIUS et al., 2020).

Os fatores de virulência de espécies leveduriformes são também essenciais para o sucesso desses microrganismos no estabelecimento da doença, com produção de enzimas hidrolíticas, adesão e formação de biofilme (MOHAMMADI et al., 2020; TALAPKO et al., 2021). A formação de biofilme contribui para a persistência no local da infecção (GUPTA et al., 2016), as proteinases e fosfolipases contribuem para alteração de fosfolípidos e proteínas, facilitando a invasão na célula hospedeira (MONIKA, 2019).

As alterações relacionadas à onicomiose por *Candida* spp. incluem distrofia da placa ungueal, espessamento, coloração branco-amarelada, muitas vezes, pigmentação e são subdivididas em três categorias: *Candida* paroníquia, *Candida* granuloma e *Candida* onicólise (RATHER, et al., 2021).

A invasão da placa ungueal, secundária à infecção dos tecidos moles ao redor da unha é caracterizada por *Candida* paroníquia e progressivamente resulta em uma unha áspera, irregular, convexa e distrófica. *Candida* granuloma é exclusividade de pacientes com candidíase mucocutânea crônica e caracteriza-se pela invasão de toda espessura ungueal, resultando em inchaço das dobras ungueais laterais e proximais com deformidade dos dedos (pseudo-baqueteamento). Por fim, *Candida* onicólise evidencia hiperqueratose subungueal distal com uma massa cinza-amarelada que se desprende da lâmina ungueal, levando a separação ou lise da unha (Figura 4) (ANDRES, ALEXANDRO, 2020).

Figura 4. Manifestação clínica de onicomicoses por *Candida*: (a) (b) *Candida* paroníquia e onicólise; (c) Melanoníquia fúngica com coloração esverdeada ou acastanhada; (d) *Candida* granulomatosa; (e) Exame direto (KOH), múltiplas leveduras são observadas (40×).



Fonte: (ANDRES; ALEXANDRO, 2020)

2.5 Onicomicoses causadas por fungos filamentosos não dermatófitos

Os principais agentes causadores dessa categoria são *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Scopulariopsis* spp., *Acremonium* spp. e *Neoscytalidium* spp. (Figura 5). São fungos hialinos ou demáceos, encontrados no ambiente como sapróbios ou fitopatógenos, e em quadro de infecções de unhas vivem na região intercelular de tecido não queratinizado (PAKSHIR et al., 2021). A frequência de FFNDs nas unhas, de ocorrência mundial, teve aumento considerável de casos, de 4,3 a 21,1% (REINEL, 2021). O uso generalizado de antibióticos de amplo espectro, imunossupressão, quimioterapia, doenças crônicas e o envelhecimento populacional são fatores determinantes para esse aumento (MOTAMEDI et al., 2016).

Figura 5. Onicomicoses causadas por diferentes espécies de FFNDs: (A) *Aspergillus terreus*; (B) *Aspergillus niger*; (C) *Fusarium* spp.; (D) *Chrysosporium* spp.; (E) *Acremonium* spp.; (F) *Scopulariopsis* spp.

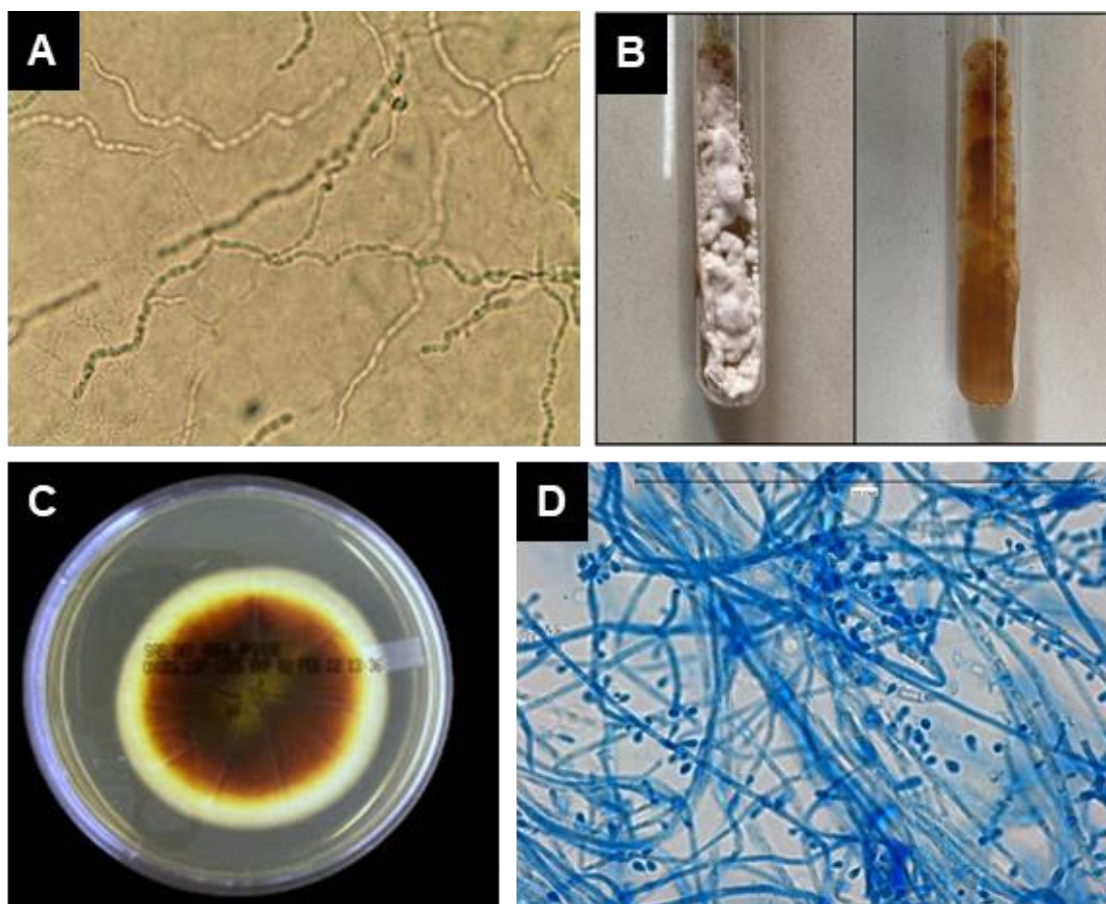


Fonte: (MOTAMEDI et al., 2016).

2.6 Diagnóstico das onicomicoses

O correto diagnóstico das onicomicoses é essencial para o sucesso terapêutico e consiste em exame clínico e laboratorial. No exame clínico, são observadas alterações na estrutura da lâmina ungueal, como espessamento, rugosidade e discromia. Já para o exame laboratorial, a microscopia e cultura revelam a presença de estruturas e identificação das espécies (Figura 6) (LIM et al., 2021). Essas técnicas combinadas com uma ampla gama de ferramentas recém-desenvolvidas possibilitam o diagnóstico com maior sensibilidade e especificidade (BEUSCHER; KELECHI, 2019).

Figura 6. Diagnóstico laboratorial das onicomicoses: (A) Exame direto com hidróxido de potássio KOH a 10% evidenciando estruturas de hifas hialinas; (B) Cultura de dermatófitos em tubo com Agar Sabouraud Dextrose (ASD); (C) colônia com 7 dias de crescimento em ASD e (D) identificação micromorfológica por lâmina de durex com azul de algodão (40x).



Fonte: (GAUTAM et al., 2021)

O exame direto microscópico com hidróxido de potássio (KOH) é uma técnica simples, rápida e barata utilizada para detectar estruturas fúngicas. Envolve a recuperação da amostra do leito ungueal dissolvendo-a em KOH a 10%, que por sua vez dissolve a queratina, permitindo a visualização microscópica das estruturas fúngicas. As amostras podem ser posteriormente tratadas com corantes como azul de algodão. Apresenta uma sensibilidade de aproximadamente 61% e especificidade de 95%, entretanto não permite especificar o tipo de organismo patogênico (VELASQUEZ-AGUDELO; CARDONA-ARIAS, 2017).

A cultura fúngica é utilizada para identificar o patógeno específico. A amostra subungueal é cultivada em ágar Sabouraud Dextrose (ASD) a 26 - 30°C por período

médio de 20 dias. Alguns meios são tratados com cloranfenicol e gentamicina (Agar Sabouraud Modificado - ASM) para evitar contaminação bacteriana e com cicloheximida (Mycobiotic - MB), o que impede o crescimento de contaminantes de ambiente. A cultura fúngica é de alta especificidade (99%) com baixa sensibilidade (56%). Após crescimento em meio específico, a etapa posterior inclui a identificação do microrganismo por análise de estruturas micromorfológicas (GUPTA et al., 2022).

A avaliação histopatológica também pode ser realizada com análise de características microscópicas de espécimes de corte de unhas embutidos em blocos de parafina. Nessa técnica, um fragmento de unha com pelo menos 4 mm da borda livre é utilizado. Posteriormente, utiliza-se a técnica de coloração com ácido periódico-Schiff (PAS), a qual oxida grupos hidroxila da parede celular de esporos, hifas, pseudohifas e leveduras, em aldeídos, demonstrando cor avermelhada. Com o uso da coloração de prata metanamina Gomori-Grocott (GMS), o ácido crômico oxida a parede celular, em seguida, reduz o nitrato de prata metanamina em prata metálica, para produzir uma cor marrom. Essa técnica é altamente sensível (84%) e específica (89%), porém em comparação ao exame microscópico direto com KOH é bem dispendiosa, além de ser incapaz de especificar o agente causador (LAVORATO et al., 2017; LECERF et al., 2021).

A dermatoscopia ou onicoscopia de unha é uma ferramenta não invasiva do leito ungueal que permite a visualização de características microscópicas de unhas anormais como bordas proximais irregulares da área onicolítica com pontas e estrias longitudinais, opacidades ou meloníquia. É uma técnica rápida, não invasiva e de baixo custo, com potencial para identificação de onicomicoses (NADA et al., 2020).

Ensaio moleculares, incluindo reações em cadeia da polimerase (PCR), citometria de fluxo e espectrometria de massa são ferramentas avançadas de diagnóstico. A PCR consiste em amplificar o DNA fúngico e detectá-lo com primers fluorescentes (TROVATO et al., 2022). A PCR em tempo real é a forma mais usada, pois é relativamente simples de conduzir, pode detectar vários organismos. Ensaio desenvolvidos relatam sensibilidade de 85-100% e especificidade de 94-100% na detecção de dermatófitos, porém não estão amplamente disponíveis devido ao custo (WATANABE; ISHIDA, 2017). A citometria de fluxo separa as células de acordo com o tamanho, granulosidade e presença de marcadores de DNA e proteínas. A espectrometria de massa envolve o carregamento de espécies químicas e a separação de íons de acordo com sua razão massa-carga. Ressalta-se que, essas

técnicas são experimentais, isto é, não fazendo parte de protocolos de rotina laboratorial (LIM et al., 2021).

2.7 Tratamento das onicomicoses

As opções de tratamento incluem terapia antifúngica oral, tópica, terapia a laser, terapia fotodinâmica e, nos casos mais severos, remoção cirúrgica da lâmina ungueal.

A terapia antifúngica oral é considerada o padrão-ouro para crianças e adultos devido ao período mais curto de tratamento e maiores taxas de cura, quando comparada à terapia tópica. Considera-se esta forma de terapêutica para todos os tipos de onicomicoses, principalmente quando o comprometimento da lâmina ungueal é superior a 50%. Os agentes antifúngicos orais usados para o tratamento da onicomiose incluem terbinafina, itraconazol e fluconazol (LIPNER et al., 2021; KHURANA; SARDANA; CHOWDHARY, 2019).

A terbinafina é um fármaco pertencente ao grupo das alilaminas com ação sobre biossíntese de ergosterol, através da inibição da enzima esqualeno epoxidase e, subsequente conversão de esqualeno em epóxido de esqualeno. O acúmulo intracelular de esqualeno resulta na morte da célula fúngica (CAMPOY; ADRIO, 2017; MAXFIELD et al., 2022).

Os fármacos fungistáticos fluconazol e itraconazol pertencem a classe dos azóis e atuam sobre a monooxigenase lanosterol 14-alfa-demetilase (citocromo P-450-dependente), enzima necessária para a conversão do lanosterol em ergosterol. As alterações induzidas na membrana levam a aumento de permeabilidade, resultando em lise e morte celular (DOĞAN et al., 2017). O tratamento com esses fármacos deve ser considerado para pacientes que não toleram ou não respondem à terbinafina oral ou cuja onicomiose é causada por leveduras ou fungos filamentosos não dermatófitos (SHAFIEI et al., 2020).

O uso prolongado dos fármacos antifúngicos ocasiona uma ampla gama de efeitos adversos como dores de cabeça, distúrbios do paladar, desconforto gastrointestinal, dermatite, anorexia, vômitos, dor epigástrica, diarreia, interações medicamentosas e, raramente, depressão, neutropenia, disfunção hepática e ventricular, síndrome de Steven-Johnson, infecção respiratória superior e hipertrigliceridemia (YANG et al., 2021).

O tratamento tópico, como esmaltes terapêuticos, pode ser considerado para casos de onicomicoses leves a moderadas (comprometimento ungueal < 50%) ou para os casos de intolerância à terapia oral (GUPTA et al., 2019). Efinaconazol (solução para unhas a 10%), tavaborole, ciclopirox, amorolfina e terbinafina (10% solução para unhas) se apresentam como opções terapêuticas tópicas, de efeitos adversos mínimos (eritema periungueal e queimação no local da aplicação). Entretanto, esta forma de tratamento requer períodos mais longos de adoção (> 48 semanas) provavelmente, devido a lenta penetração em placa ungueal (LEUNG et al., 2019). Na procura de adequação terapêutica, os antifúngicos tópicos vêm sendo usados em combinação com a terapia antifúngica oral, considerando a ação antifúngica combinada de duas vias administrativas (MONOD; MÉHUL, 2019).

A terapia a laser utiliza o princípio da fototermólise seletiva, em que a energia é preferencialmente absorvida pelos micélios fúngicos, com rápida elevação da temperatura e morte celular resultante. Como o tratamento é direcionado, o tecido circundante não é afetado, eliminando assim o potencial de eventos adversos sistêmicos. As terapias a laser são seguras, mas caras e, são indicadas para pacientes nos quais os agentes antifúngicos sistêmicos são contraindicados (MA et al., 2019; ZALACAIN et al., 2018; ZHANG et al., 2022).

A terapia fotodinâmica, outra forma terapêutica, envolve a fotoativação (MORGADO et al., 2017), cuja energia reage com o oxigênio dissolvido no tecido, resultando na formação de espécies reativas de oxigênio e radicais livres que são citotóxicos. O fungo absorve o fotossensibilizador, tornando-o mais suscetível à destruição por apoptose (SHEN et al., 2020). Os fotossensibilizadores mais utilizados incluem ácido 5-aminolevulínico (5-ALA), metilaminolevulinato (MAL), porfirinas, cloreto de alumínio-ftalocianina, azul de metileno, azul de toluidina e rosa de bengala (ALBERDI; GÓMEZ, 2020). São necessários novos estudos para confirmar a eficácia da terapia fotodinâmica, a fim de fazer recomendações formais quanto ao seu uso no tratamento de onicomicoses.

2.8 Implicações clínicas em onicomicoses de etiologia mista

A mudança no perfil epidemiológico das onicomicoses, associada a baixa resposta ao tratamento com antifúngicos, aponta para prevalência às infecções crônicas (GUPTA et al., 2020). Isso pode ser explicado por fatores relacionados ao

patógeno como adaptabilidade ao hospedeiro, fatores de virulência ou variação de suscetibilidade a fármacos, com diversos mecanismos de resistência. Valorizados os fatores relacionados ao hospedeiro, as diferenças de resposta imune e a baixa adesão ao tratamento prolongado, além das características farmacodinâmica e farmacocinética relacionados aos fármacos, com alteração de ação e/ou absorção (LEUNG et al., 2019).

Estudos realizados sobre dermatofitoses recalcitrantes, tentam explicar as razões biológicas envolvidas, sejam relacionadas ao parasita ou hospedeiro. Nesse contexto, Gaurav e colaboradores encontraram fatores determinantes, com predomínio ao uso irracional de antifúngicos e a prática de esportes em clima quente e úmido, favorecendo a persistência e sobrevivência dos dermatófitos na pele e seus anexos. Nesse estudo 80% dos isolados demonstraram resistência a terbinafina e 66% resistência ao fluconazol (GAURAV et al, 2021).

O relato de casos de onicomicose por *Candida* e FFNDs e *Trichophyton* spp. tem sido frequente nos últimos anos, evidenciado por análise laboratorial. A análise por microscopia direta, muitas vezes, identifica positividade para fungo, com duas ou mais estruturas diferentes (hifas e leveduras), porém, com cultura não correspondente, isto é, o crescimento fúngico é observado para uma única espécie (YOUSSEF et al., 2018; GÓMEZ-SÁENZ; ARENAS, 2020; GUPTA et al., 2020b).

Em levantamento global realizado por Gupta e colaboradores, dos casos de infecções mistas, a alta prevalência de FFNDs e dermatófitos foi destacada com taxas de 39%. No Brasil, Canadá e Israel, as taxas de infecções mistas foram de 61%, 34% e 22%, respectivamente, com isolamento de *Aspergillus* spp., *Scopulariopsis* spp. e *Fusarium* spp. A presença de um FFND pode contribuir significativamente para a falha terapêutica ou tempo de cura maior (2 – 4 anos) (GUPTA et al., 2020a).

A identificação do agente causal é essencial para o sucesso terapêutico, uma vez que, fármacos antifúngicos predominantemente usados para terapia contra dermatófitos, apresentam ação subótima para os outros grupos etiológicos (LIPNER et al., 2021). A terbinafina, por exemplo, é amplamente inativa contra leveduras do gênero *Candida* e possui atividade limitada para uso como monoterapia em onicomicoses causadas por FFNDs. O fluconazol, ativo contra muitas espécies de *Candida* spp. (à exceção de *C glabrata*, *C krusei* e *C parapsilosis*), é ineficaz contra FFNDs. O itraconazol, apesar de apresentar ação sobre muitos agentes dos FFNDs,

apresenta ação modesta contra *Scopulariopsis* spp. e *Fusarium* spp., importantes agentes etiológicos desse grupo (SONTHALIA; GOLDUST, 2019).

A mudança no perfil de suscetibilidade, de sensível para resistente, também deve ser considerada para os eventos biológicos. De fato, dados epidemiológicos reportados por Mesini e colaboradores, evidenciam o aumento de incidência de infecções por linhagens de *C. parapsilosis* resistentes ao fluconazol (MESINI et al., 2020). Estudos de Silva e colaboradores corroboram com esta afirmativa, e, em 60 e 65 % dos isolados foram resistentes ao itraconazol e ao fluconazol, respectivamente (SILVA et al., 2020).

Em uma extensa revisão sobre emergência de dermatófitos resistentes a terbinafina, Shen e colaboradores reportaram CIMs elevados para *T. rubrum*, *T. interdigitale* e *T. mentagrophytes*, incluindo comprovação de alterações em proteínas alvo aos resistentes ao tratamento (SHEN et al., 2022).

No nicho anatômico das unhas, interações mistas de microrganismos, provocam a síntese de metabólitos essenciais para a sobrevivência destes, com variedade de fatores de virulência como proteases, lipases e formação de biofilme, além de resistência às respostas imune do hospedeiro ou ação dos fármacos. Nesse contexto, Mohammadi e colaboradores, em análise do perfil de virulência de espécies de *Candida* isoladas de unhas, observaram correlações significativas entre a concentração inibitória mínima (CIM) de fluconazol/itraconazol e produção de biofilme, produção de fosfolipase e CIM de fluconazol/itraconazol, e CIM de fluconazol e atividade hemolítica em isolados de *C. albicans* (MOHAMMADI et al., 2020).

O estudo coordenado por Oliver e colaboradores sobre perfis químicos de metabólitos, evidenciou variedade de moléculas produzidas por espécies de *Candida* spp. isoladas de diferentes fontes de infecção. Nesse estudo, foram identificados 66 diferentes metabólitos associados à glicólise, ciclo do ácido tricarboxílico, síntese de ácidos nucleicos, metabolismo de aminoácidos e lipídios. Essas vias metabólicas estão relacionadas principalmente à produção de energia e, aos mecanismos de virulência. O perfil químico de espécies de *C. parapsilosis* incluiu concentrações de etanol, 2,3-butanodiol, tirosina e succinato (OLIVER et al, 2020).

A interferência biológica entre os dermatófitos *T. mentagrophytes* e *T. rubrum* com leveduras do gênero *Candida*, quando cultivados em meio sólido foi demonstrada pelo estudo de Lemes et al. A atividade anti-*Trichophyton* a partir de extratos

produzidos a partir de culturas puras de *Candida* spp. corrobora com o dado de interferência microbiana (LEMES et al., 2021a; LEMES et al., 2021b).

Infecções mistas em onicomicoses contribuem para falhas terapêuticas levando a quadros de recorrência e recalcitrância. A recalcitrância refere-se a um termo amplo e clinicamente relevante, pois engloba tanto a resistência *in vitro* quanto todas as outras possíveis causas de falha terapêutica (BRESCINI et al., 2021). O escasso arsenal antifúngico para o tratamento de doenças fúngicas, bem como, as mudanças biológicas sobre suscetibilidade aos fármacos têm constituído um desafio para controle das onicomicoses (GUPTA et al., 2019).

3 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Onicomicoses são infecções cujos sintomas físicos, como dores e desconforto, e implicações psicológicas são comuns. As pessoas afetadas estão menos dispostas a participar de atividades sociais e de lazer, promovendo o estado mental alterado (GUPTA et al., 2018). O impacto econômico é relevante uma vez que os gastos são elevados aos serviços de saúde entre consultas médicas e tratamento (LEUNG et al., 2019).

Falhas no diagnóstico laboratorial de onicomicoses está diretamente relacionada a falhas na terapêutica. O tratamento longo e dispendioso com antifúngicos pode levar a efeitos adversos como hepatotoxicidade e nefrotoxicidade. A baixa adesão terapêutica, possibilita o aumento de casos de infecções recorrentes e recalcitrantes, e o surgimento de microrganismos resistentes a antifúngicos (LIPNER et al., 2021).

Considerando o ambiente fisiológico variável, quanto aos constituintes químicos, especialmente nos quadros de infecções mistas, tem-se uma proposta científica a ser explorada, uma vez que novas moléculas de resposta antifúngica podem estar presentes e se constituírem como alternativa para novas abordagens terapêuticas das onicomicoses.

4 OBJETIVO

O presente estudo avaliou a atividade antifúngica de extratos de culturas puras e mistas de *Candida parapsilosis*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum* contra linhagens de *Candida* spp. e *Trichophyton* spp.

4.2 Objetivos específicos

- Preparar extratos de culturas puras de *C. parapsilosis*, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*;
- Preparar extratos de culturas mistas de *C. parapsilosis* com *T. mentagroyhtes* e *C. parapsilosis* com *T. rubrum*;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), *in vitro*, e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos extratos frente às linhagens de *Candida* spp. e *Trichophyton* spp.;
- Determinar o perfil de suscetibilidade, *in vitro*, das linhagens de *Candida* spp. frente ao fluconazol;
- Determinar o perfil de suscetibilidade, *in vitro*, das linhagens de *Trichophyton* spp. frente ao fluconazol, itraconazol e terbinafina;
- Avaliar o efeito combinatório, *in vitro*, dos extratos fúngicos com fluconazol, itraconazol e terbinafina frente às linhagens de *Trichophyton* spp. pelo método de *Checkerboard*;
- Investigar o alvo de ação dos extratos sobre parede celular fúngica ou membrana, através de ensaios com sorbitol e ergosterol, respectivamente;
- Determinar a cinética de morte - *Time kill* das linhagens de *Trichophyton* spp. na presença dos extratos;
- Avaliar toxicidade dos extratos com modelo invertebrado de *Galleria mellonella*;
- Determinar o perfil químico dos extratos através da técnica de FTIR (infravermelho transformada de Fourier).

5 METODOLOGIA

5.2 Linhagens fúngicas

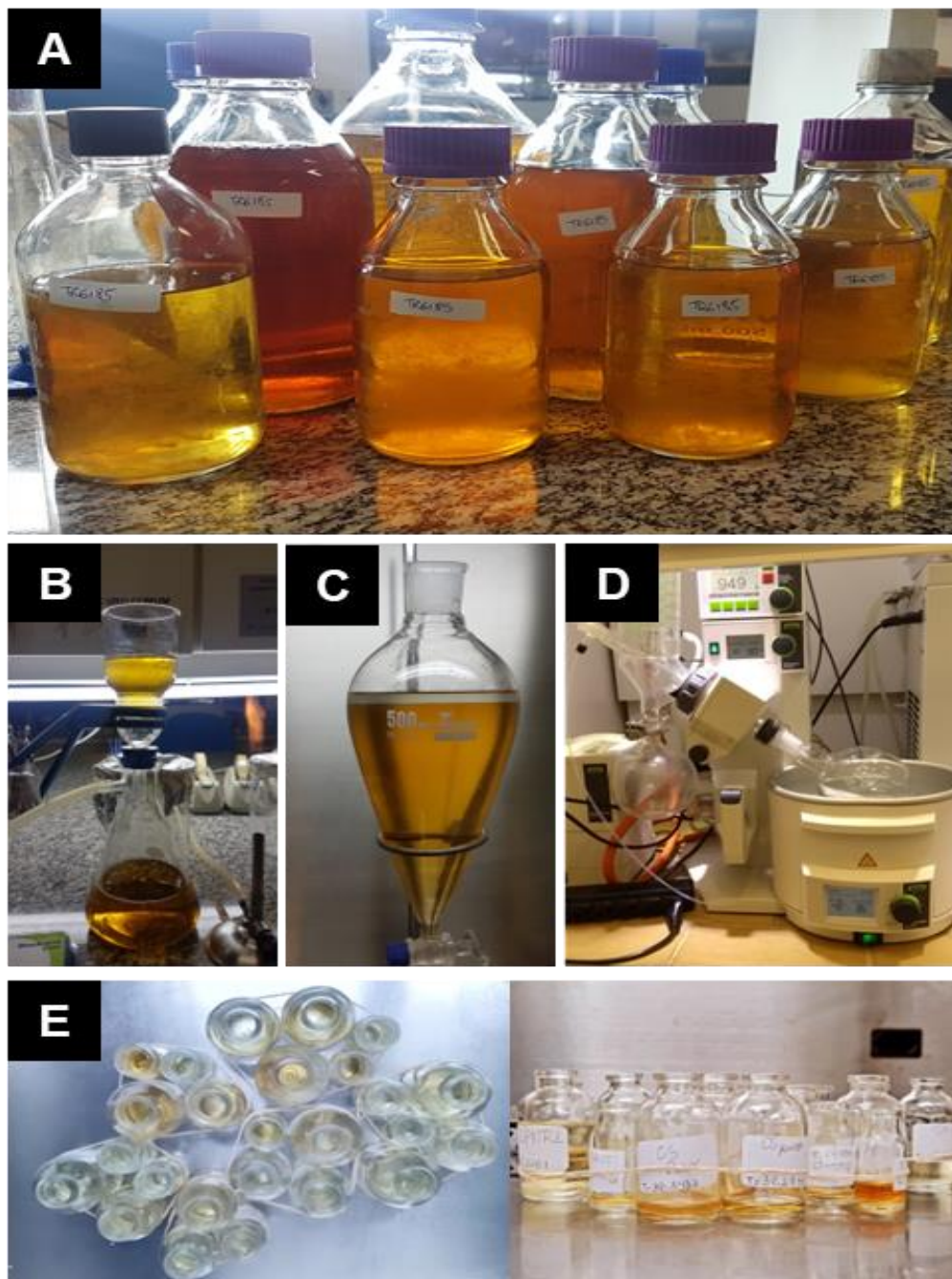
Foram utilizados para esse estudo linhagens de *Candida albicans*, *Candida auris*, *Candida parapsilosis*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum* pertencentes a coleção do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, São Paulo, Brasil, e da *American Type Culture Collection* (*C. albicans* 90028 CAATCC; *C. parapsilosis* 22019 CPATCC; *T. mentagrophytes* 11481 TMATCC) e do *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (*T. rubrum* 118892 TRCBS; *C. auris* 10913 CAUCBS). Todos os isolados foram registrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o protocolo número AF41CDD.

5.3 Obtenção dos extratos de culturas puras e mistas

Para obtenção do extrato de cultura de *C. parapsilosis* (CP4), colônias foram repicadas em Ágar Sabouraud (ASD) e incubadas a 35°C por 24 horas. Após esse período, 5 mL de suspensão do inóculo em salina estéril (0,85%), com turbidez correspondente a escala 10 de MacFarland, foram inoculadas em 500 mL de Caldo Sabouraud Dextrose (CSD) e incubados em estufa a 35° C por 72 horas. Para obtenção do extrato de cultura pura de *T. mentagrophytes* (TM3) e *T. rubrum* (TR1), colônias de dermatófitos com 7 dias de crescimento a 35° C em Agar Batata Dextrose, foram cobertas com salina estéril. Posteriormente, a mistura de conídios e hifas foram transferidos para 500 mL de CSD e incubados a 35° C por 120 horas. Para a preparação dos extratos de culturas mistas (CP4+TM3/CP4+TR1) 5mL de suspensão dos inóculos de *C. parapsilosis* e *Trichophyton* spp. foram transferidos para 500 mL de CSD e incubados a 35° C por 120 horas.

Os meios de cultura contendo os inóculos foram filtrados em membrana millipore 0.2 µm e submetidos à extração líquido-líquido, utilizando-se acetato de etila como contra-fase. O procedimento foi repetido três vezes, para extração máxima dos metabólitos fúngicos dos meios de cultura. A fase acetato de etila foi submetida a evaporador rotativo para secagem. O composto resultante em massa foi solubilizado em solução de água destilada estéril com dimetil sulfoxido (DMSO) a 10% (Figura 7).

Figura 7. Obtenção dos extratos de culturas puras e mistas: (A) Culturas em Caldo Sabouraud Dextrose; (B) Filtração em sistema fechado com membrana 0.2 μm ; (C) extração líquido-líquido com acetato de etila do filtrado; (D) secagem em rotaevaporador; (E) massa resultante dos extratos.



Fonte: O autor.

5.4 Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das linhagens de dermatófitos frente aos extratos e fármacos itraconazol, fluconazol, terbinafina.

O perfil de suscetibilidade das linhagens de dermatófitos frente aos extratos e fármacos, foi determinado por técnica de microdiluição de acordo com o protocolo descrito no documento M38- 3rd do *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI), com modificações (CLSI, 2017a). Para o preparo do inóculo de dermatófitos, as linhagens foram cultivadas em Agar Batata Dextrose (ABD) a 35° C por 7 dias. Após esse período, a superfície da colônia coberta com 5 mL de salina estéril (0.85%), foi raspada com alça estéril. A mistura de conídios e fragmentos de hifas foi transferida para um tubo estéril, permitindo a precipitação de estruturas mais pesadas. O sobrenadante foi transferido para novo tubo estéril com homogeneização em vórtex por 15 segundos. O inóculo foi ajustado em espectrofotômetro com leitura a 530 nm, seguido de diluição na proporção 1:50 em meio RPMI – 1640 (*Sigma-Aldrich® - Rosen Park Media Institute*) com concentração final de 0.4 a 5×10^4 células/mL. Posteriormente, inoculou-se 0.1 mL da suspensão de inóculo em placas de poliestireno de 96 poços, contendo meio RPMI-1640 nas diferentes concentrações dos extratos (4000 – 1.9 µg/mL) e fármacos testados: itraconazol 4 – 0.06 µg/mL, fluconazol e terbinafina 64 - 1 µg/mL. Foram preparados poços controles de esterilidade (contendo 0.2 mL de RPMI) e de crescimento (contendo apenas inóculo e RPMI). As placas foram incubadas a 35°C por 120 horas. A CIM dos fármacos para fluconazol e itraconazol foi determinada como a menor concentração capaz de inibir 80% do crescimento fúngico (CIM80), para os extratos e terbinafina, foi considerada a concentração capaz de inibir 100% (CIM100). Todos os testes foram realizados em triplicata.

5.5 Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das linhagens de *Candida* spp. frente ao extrato de *Candida parapsilosis* e fluconazol

O perfil de suscetibilidade das linhagens de *Candida* spp. frente ao extrato de *Candida parapsilosis* e fluconazol foi determinado por técnica descrita no protocolo M27- Ed4 2017 do *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI), com modificações (CLSI, 2017b). Para o preparo do inóculo de leveduras, suspensões de colônias com crescimento de 24h em ágar Sabouraud Dextrose foram feitas em salina estéril 0.85%. Após essa etapa, diluições foram realizadas em 1:100 – 1:20 em meio RPMI – 1640,

com obtenção de uma concentração final de inóculo de $5 \times 10^2 - 2.5 \times 10^3$ UFC/mL. Posteriormente, inoculou-se 0.1 mL da suspensão de inóculos em placas de poliestireno de 96 poços, contendo meio RPMI-1640 nas diferentes concentrações do fluconazol (128 – 0.25 µg/mL) e extratos (2000 – 15.6 µg/mL). Foram preparados poços controles de esterilidade (contendo 0.2 mL de RPMI) e de crescimento (contendo apenas inóculo e RPMI). As placas foram incubadas a 35°C por 24h. A CIM do fluconazol foi determinada como a menor concentração capaz de inibir 70% do crescimento fúngico (CIM70), enquanto a CIM do extrato, foi considerada a menor concentração capaz de inibir 100% (CIM100) do crescimento fúngico. Todos os testes foram realizados em triplicata.

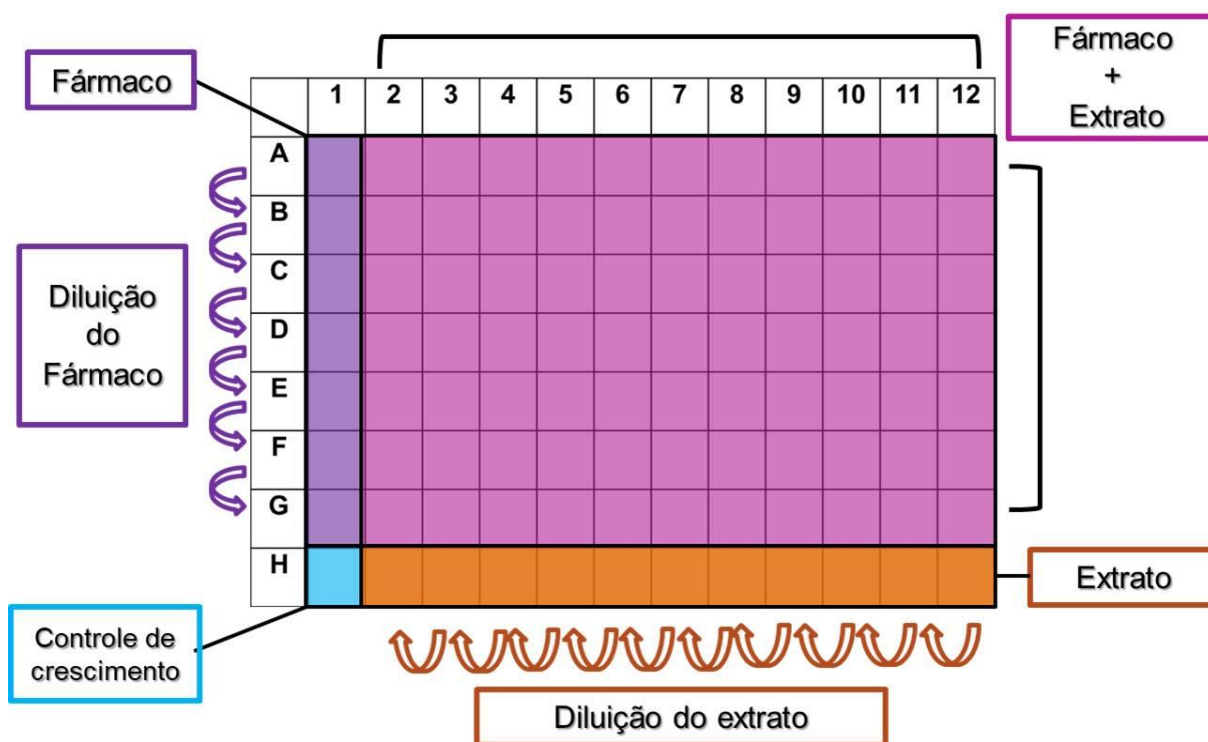
5.6 Determinação da Concentração Fungicida Mínima

Para a determinação da concentração fungicida mínima (CFM), uma alíquota de cada poço das placas preparadas com extratos e inóculos foi transferida em placas de Petri contendo Agar Sabouraud Dextrose com o auxílio de hastes de madeira estéreis. O CFM foi definido como a menor concentração do extrato de inibir crescimento visível em meio sólido. Todos os testes foram realizados em triplicata.

5.7 Ensaio *Checkerboard*

A avaliação do efeito combinatório entre os extratos fúngicos com itraconazol, fluconazol e terbinafina foi realizada através do ensaio de *Checkerboard* (baseado no protocolo M27- Ed4 2017) com a linhagem TRCBS. Para preparação do inóculo seguiu-se as mesmas recomendações citadas no item 5.3. Todos os poços das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 100µL de RPMI. Fármacos foram adicionados e diluídos em suas respectivas concentrações: itraconazol 4 – 0.06 µg/mL, fluconazol e terbinafina 64 – 0.001 µg/mL. Posteriormente os extratos foram adicionados e diluídos na concentração 4000 – 1.9 µg/mL. Adicionalmente, foram distribuídos 100µL da suspensão de inóculo do dermatófito em cada poço. As microplacas foram incubadas por 120 horas, a 35°C. Após esse período, realizou-se a leitura visual das placas. Os experimentos foram realizados em triplicata. Como controle, os fármacos e extratos isolados foram testados para comparação do efeito combinatório (Figura 8).

Figura 8. Fluxograma para avaliação do efeito combinatório dos extratos com os fármacos fluconazol, itraconazol e terbinafina.



Para avaliação da interação entre os extratos e fármacos utilizou-se a fórmula de Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF):

$$ICIF = \frac{CIM \text{ do fármaco no mix}}{CIM \text{ do fármaco isolado}} + \frac{CIM \text{ do extrato no mix}}{CIM \text{ do extrato isolado}}$$

A partir do cálculo de ICIF a interação foi avaliada seguindo a classificação descrita por Kumar e colaboradores (2012), onde: $CIF \leq 0.5$ para ação sinérgica; $0.5 < CIF \leq 1$ para ação aditiva; $1 < CIF \leq 2$ para indiferente; $CIF > 2$ para ação antagônica (KUMAR et al., 2012).

5.8 Ensaio com sorbitol e ergosterol

Ensaio com RPMI suplementado com sorbitol (PM = 182.17) a 0.8 M foram realizados para avaliar ação sobre a parede celular fúngica, segundo protocolo de Castro, 2015. As CIMs dos extratos frente a TRCBS foi obtida por técnica de microdiluição, conforme descrito no item 5.3.

Para avaliação da interação dos extratos com a membrana celular, as CIMs contra TRCBS foram determinadas na presença do ergosterol exógeno com suplementação do meio RPMI com 400 µg/mL. Os valores das CIMs dos extratos foram então comparados na ausência e na presença do sorbitol e ergosterol exógeno. Para controle dos meios suplementados, o mesmo procedimento foi conduzido com os fármacos caspofungina, e anfotericina B, cujo mecanismo de ação envolve a interação com parede e membrana celular fúngica. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos pela média geométrica (CASTRO et al., 2015).

5.9 Ensaio de cinética de morte - *Time kill*

Ensaio sobre cinética de morte foi conduzido de acordo com método descrito por Klepser et al. (1998), com a linhagem TRCBS. Valores 2x CIM obtidos por microdiluição em caldo foram utilizados para este ensaio. O inóculo do dermatófito foi preparado a partir de cultura de 7 dias em Agar Batata Dextrose (ABD) para indução da esporulação. Suspensões de 0.1 mL de conídios foram adicionadas em 4.9 mL de Caldo Sabouraud Dextrose (CSD) obtendo-se uma concentração final correspondente a 0.4 a 5×10^4 unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Após a preparação dos inóculos, realizou-se diluição 1:1 (0.2 mL do extrato com 0.2 mL do inóculo). Tubos contendo apenas inóculo foram incluídos para avaliação do controle de crescimento. Em tempos predeterminados (8, 24, 48h) uma alíquota de 30 µl foi retirada de cada amostra, semeada em placas de Agar Sabouraud Dextrose (ASD), com auxílio de alça Drigalski e incubadas a 35° C por 120h. Posteriormente, seguiu-se com a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC). A porcentagem de inibição foi calculada por comparação com o controle de crescimento usando o método de contagem de colônias (KLEPSEK et al., 1998).

5.10 Ensaio de toxicidade com *Galleria mellonella*

O ensaio de toxicidade dos extratos, foi realizado em larvas do modelo experimental de toxicidade *G. mellonella* de acordo com protocolo descrito por Ignasiak e Maxwell, 2017 (IGNASIAK; MAXWELL, 2017). Para cada condição, foram separadas 5 larvas de *G. mellonella* (275 ± 25 mg) no sexto instar de desenvolvimento em placas de Petri (90x15 mm). Os volumes de 5 µl do composto foram injetados na

última pró-pata direita das larvas utilizando micro seringa de Hamilton modelo 7000.5KH de 10 µl nas concentrações de 2000 µg/mL. Os controles do experimento foram larvas intocadas (naïve), larvas inoculadas com 10% etanol (controle positivo de toxicidade) e DMSO 10% (controle negativo de toxicidade). As larvas foram incubadas a 37°C, privadas de alimentação e iluminação direta. Foram feitas avaliações da sobrevivência das larvas a cada 24 h, durante 5 dias e também foram retiradas diariamente as formações de pré-pupas para retardar sua metamorfose. A confecção dos gráficos e análises estatística foi feita por meio do método Log-rank (Mantel-COX) no software Origin.

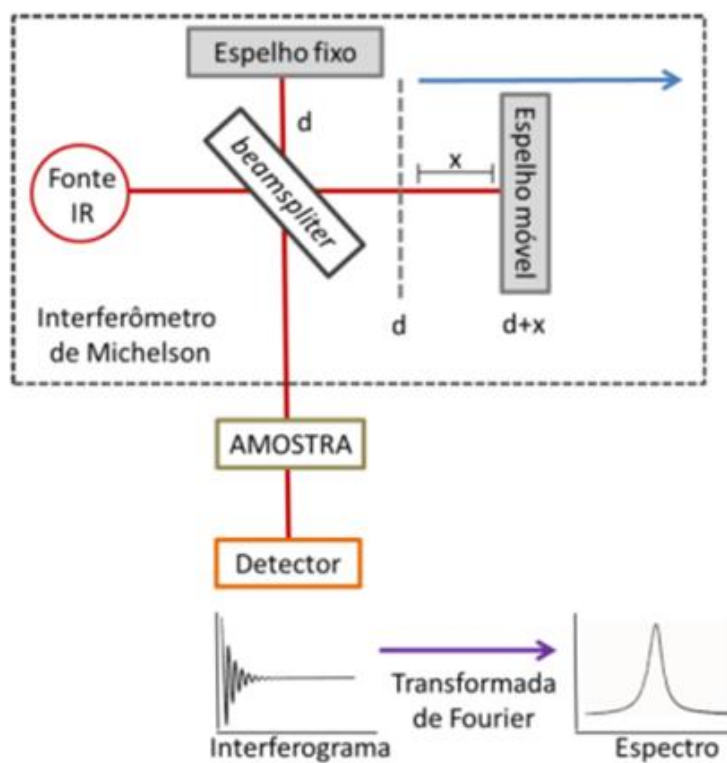
5.10 Determinação do perfil químico dos extratos por infravermelho transformada de Fourier (FTIR)

Para a determinação do perfil químico dos extratos, utilizou-se a espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), um importante método utilizado para a caracterização e identificação de formas cristalinas e grupos funcionais de substâncias devido à alta confiabilidade, rapidez, e custo relativamente baixo. Esta técnica permite análises qualitativas e semi-quantitativas de amostras (TKACHENKO; NIEDZIELSKI, 2022).

A estrutura e funcionamento de um espectrômetro FTIR compreende três componentes básicos: a fonte de radiação no infravermelho médio; um interferômetro de Michelson, formado por dois espelhos, sendo um fixo e outro móvel; e um divisor de feixe, composto de um cristal de brometo de potássio (KBr) (GEINGUENAUD; MILITELLO; ARLUISON, 2020).

A radiação emitida por uma fonte no infravermelho passa por um interferômetro antes de incidir na amostra. A radiação não absorvida pela amostra incide em um detector, um interferograma que mede a intensidade da radiação detectada em função do deslocamento x do espelho móvel. O espectro de absorção no infravermelho é obtido através da transformada de Fourier no interferograma coletado, o qual apresenta o número de onda da radiação absorvida na forma de bandas (Figura 9) (LIMA, 2015).

Figura 9. Esquema de funcionamento de espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier.



Fonte: (LIMA, 2015)

Para o ensaio do atual estudo, as amostras foram depositadas sobre cristal de seleneto de zinco (ZnSe) em acessório UATR (Universal Reflexão Total Atenuada - Perkin-Elmer, Nº de registro L1250050). Os espectros foram adquiridos em triplicata no modo absorbância, em espectrômetro Spectrum 400 FTIR/FT-NIR, com 4 pulsos (*scans*) de varredura, na faixa de $4000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ usando laser de hélio-neon (He/Ne) de 633 nm, detector DTGS e apodização pela função Happ-Ganzel.

Para o processamento dos dados, triplicatas de espectros de cada amostra foram normalizadas pela amplitude (entre 0 - 1) e, posteriormente, por normalização vetorial. Em seguida, foi obtido o espectro médio de cada amostra (média aritmética de absorbância normalizada em cada número de onda).

A atribuição das bandas de absorção mais relevantes foi conduzida usando tabelas de referência para compostos orgânicos em sistemas biológicos (COATES, 2006; FARAMARZI et al., 2023) cujas principais informações estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Atribuições das principais bandas de compostos orgânicos para FTiR/ATR na faixa de 4000 - 650 cm^{-1} .

Máximo de absorção/ Faixa espectral (cm^{-1})	Atribuição	Classe de função/composto orgânico
3645-3600	$\nu\text{O-H}$, (estreita)	OH livre (não ligado)
3645-3630	$\nu\text{O-H}$	álcool primário
3640-3630	$\nu\text{O-H}$	fenol
3635-3620	$\nu\text{O-H}$	álcool secundário
3620-3540	$\nu\text{O-H}$	álcool terciário
3570-3200	$\nu\text{O-H}$, ponte de hidrogênio intramolecular (ampla)	
3570-3540	$\nu\text{O-H}$	OH ligado internamente
3550-3450	$\nu\text{O-H}$	OH dimérico
3510-3460 + 3415-3380	$\nu\text{N-H}$	amina primária aromática
3490-3430	$\nu\text{N-H}$	amina heterocíclica
~3450	$\nu\text{N-H}$	amina secundária aromática
3400-3380 + 3345-3325	$\nu\text{N-H}$	amina primária alifática
3400-3200	$\nu\text{O-H}$	OH-polimérico
3360-3310	$\nu\text{N-H}$	amina secundária alifática
3350-3320	$\nu\text{N-H}$	imina
3300-2500	$\nu\text{O-H}$ (absorção primária)	ácidos carboxílicos
3130-3070	$\nu\text{C-H}$	anel aromático
3095-3075/ 3040-3010	$\nu\text{C=C}$ vinil terminal	alqueno
2970-2950	$\nu\text{C-H}$ (CH_3) assimétrica	alcano (cadeias alifáticas)
2935-2915	$\nu\text{C-H}$ (CH_2) assimétrica	alcano (cadeias alifáticas)
2880-2860	$\nu\text{C-H}$ (CH_3) simétrica	alcano (cadeias alifáticas)
2865-2845	$\nu\text{C-H}$ (CH_2) simétrica	alcano (cadeias alifáticas)
~2600	$\nu\text{O-H}$ (absorção secundária)	ácidos carboxílicos
1750-1730	$\nu\text{C=O}$	ésteres
1740-1725	$\nu\text{C=O}$	aldeído
1725-1705	$\nu\text{C=O}$	cetona
1725-1700	$\nu\text{C=O}$	ácido carboxílico
1690-1675	$\nu\text{C=O}$	quinona, cetona conjugada
1680-1630	$\nu\text{C=O}$ (amida I)	amida
1650-1590	$\delta\text{N-H}$	amina primária
1650-1550	$\delta\text{N-H}$	amina secundária
1680-1620	$\nu\text{C=C}$	alqueno
1625	$\nu\text{C=C}$ aril substituído	alqueno
1615-1580	$\nu\text{C=C-C}$	anel aromático
1610-1550	$\nu\text{C=O}$, CO_2^-	sal de ácido carboxílico
1600	$\nu\text{C=C}$ conjugado	alqueno/polieno
1600-1500	$\nu\text{C-N} + \delta\text{N-H}$ (Amida II)	amida
1549-1545	$\delta\text{N-H}$	Amida II(lipídios)
1510-1450	$\nu\text{C=C-C}$	anel aromático
1485-1445	$\delta\text{C-H}$ (CH_2)	alqueno
1470-1430	$\delta\text{C-H}$ (CH_3) assimétrica	cadeias alifáticas
1420-1410	$\delta\text{C-H}_{\text{ip}}$ vinil	alqueno
1420-1300	$\nu\text{C=O}$, CO_2^-	sal de ácido carboxílico
1385-1380/1370-1365	$\delta\text{C-H}$ (CH_3) dimetil geminal	cadeia alifática

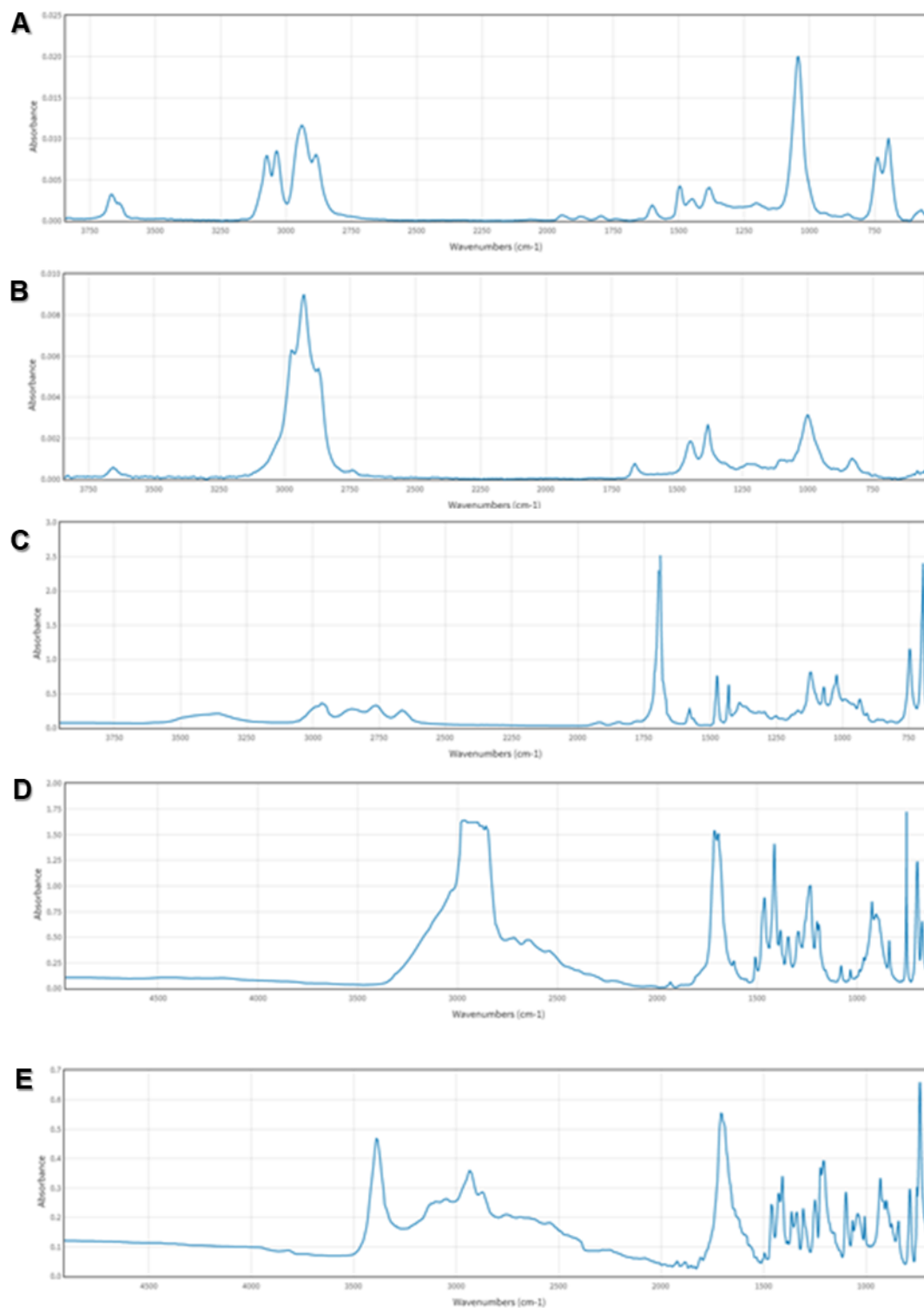
Máximo de absorção/ Faixa espectral (cm ⁻¹)	Atribuição	Classe de função/composto orgânico
1380-1370	δ C-H (CH ₃) simétrica	cadeia alifática
1360-1310	ν C-N	amina aromática terciária
1350-1280	ν C-N	amina aromática secundária
1350-1260	δ O-H	álcool primário/secundário
1350-1250	ν O=P<	fosfato orgânico
1340-1250	ν C-N	amina aromática primária
1310-1290	δ C-H _{ip} vinilideno	alqueno
1240-1190/995-850	ν P-O-C	fosfato aromático
1210-1150	ν C-N	amina terciária
~1200	ν C-O	fenol
1190-1130	ν C-N	amina secundária
~1150	ν C-O	álcool terciário
~1100	ν C-O	álcool secundário
1090-1020	ν C-N	amina primária
~1050	ν C-O	álcool primário
1050-990	ν P-O-C	fosfato alifático
995-985	δ C-H _{op} vinil	alqueno
895-885	δ C-H _{op} vinilideno,	alqueno
970-960	<i>trans</i> - δ C-H _{op}	alqueno
960-850	δ O-H _{op}	ácidos carboxílico
915-890	Vinil C-H _{op}	alqueno
750-720	-(CH ₂) _n - <i>rocking</i> $n \geq 3$	alcano
700	<i>cis</i> - δ C-H _{op} (ampla)	alqueno

ν = deformação axial, estiramento; δ = deformação angular; ip = *in plane* (no plano); op = *out of plane* (fora do plano).

Fonte: (COATES, 2006; FARAMARZI et al., 2023)

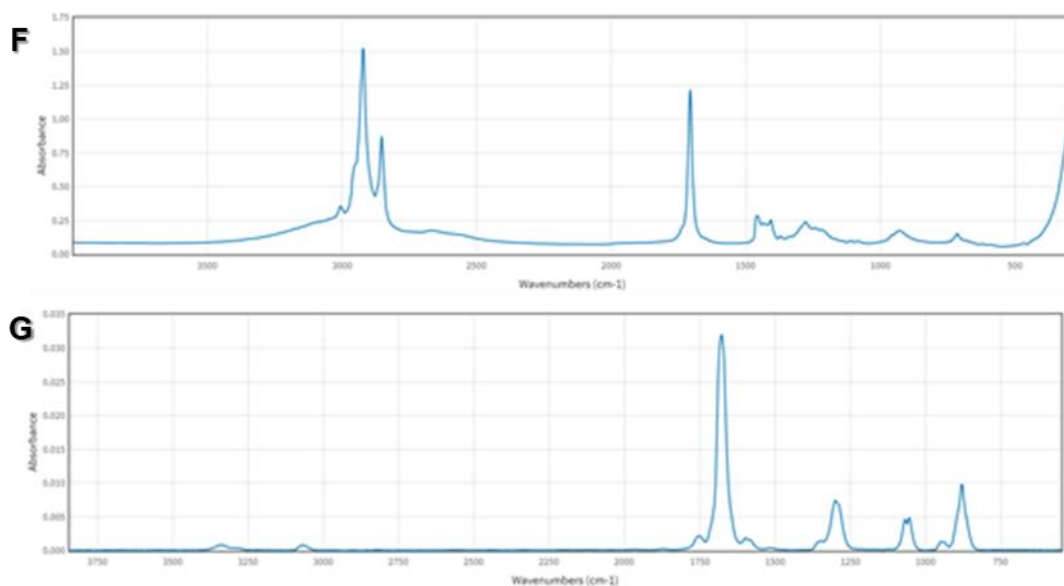
A complementação das atribuições foi realizada utilizando alguns compostos padrões (Figura 10) da biblioteca de espectros FTIR do livro de Química do *National Institute of Standards and Technology* - NIST (NIST, 2023).

Figura 10. Espectros FTIR de alguns compostos padrões pertencentes a biblioteca do NIST da web: (A) 2-Feniletanol; (B) Farnesol; (C) Fenilacetaldéido; (D) Ácido Fenilacético; (E) Ácido indolacético; (F) Ácido oleico e (G) Benzoquinona.



(NIST, 2023)

Figura 10. Espectros FTIR de alguns compostos padrões pertencentes a biblioteca do NIST da web: (A) 2-Feniletanol; (B) Farnesol; (C) Fenilacetaldeído; (D) Ácido Fenilacético; (E) Ácido indolacético; (F) Ácido oleico e (G) Benzoquinona.



(NIST, 2023)

A associação entre absorvâncias de comprimentos de onda foi avaliada em espectros médios pelo coeficiente de correlação de Pearson. A Análise Exploratória foi aplicada ao conjunto de triplicatas espectrais após centragem na média dos dados brutos (sem posterior transformação de absorvâncias normalizadas vetorialmente).

6 RESULTADOS

6.2 Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das linhagens de dermatófitos frente aos extratos e fármacos

O perfil de suscetibilidade das linhagens de dermatófitos frente aos fármacos antifúngicos são apresentados na tabela 2. Valores de CIMs para fluconazol variaram de 2 – 32 µg/mL para as linhagens de dermatófitos. Os maiores valores foram encontrados para as linhagens de *T. mentagrophytes* - TM5094, TM6084 e TM6007 (32 µg/mL) - e os menores para as linhagens de *T. rubrum* - TRCBS, TR7604, TR7984 (2 µg/mL). Para itraconazol os valores variaram de 0.5 – 2 µg/mL, sendo maior para a linhagem TM5094 (2 µg/mL) e menor para TRCBS (0.25 µg/mL). Para terbinafina, o maior valor de CIM encontrado foi para a linhagem clínica TR7259 (64 µg/mL), as demais linhagens apresentaram valor de 0.03 µg/mL.

Tabela 2. Valores de Concentração Inibitória mínima (CIM) dos fármacos fluconazol, itraconazol e terbinafina contra as linhagens de dermatófitos.

	CIM (µg/mL)		
	Fluconazol	Itraconazol	Terbinafina
TMATCC	4	0.5	0.03
TM5094	32	2	0.03
TM5419	16	1	0.03
TM6007	32	1	0.03
TM6085	32	1	0.03
TM7389	16	1	0.03
TRCBS	2	0.25	0.03
TR6185	4	0.5	0.03
TR6195	4	0.5	0.03
TR6284	4	0.5	0.03
TR7259	32	0.5	64
TR7604	2	0.5	0.03
TR7984	2	0.5	0.03

Os valores de CIMs encontrados para os extratos variaram de 250 – 8000 µg/mL. Um intervalo de menores valores foi observado nos extratos CP4 contra linhagens de *T. rubrum* e CP4TM3 contra linhagens de *T. mentagrophytes* e *T. rubrum* (250 e 500 µg/mL). Em contra ponto, um intervalo de CIMs maior foi observado para os extratos de CP4TR1 e TR1 (1000 – 8000 µg/mL). Os valores

de CFM também seguiram essa tendência, com intervalos menores para CP4TM3 (250 e 1000 µg/mL) e CP4 (500 e 1000 µg/mL). Os extratos CP4TR1 e TR1 apresentaram frequência de maiores valores de CFM (2000 – 8000 µg/mL) (Tabela 3).

Tabela 3. Intervalo de valores de Concentração Inibitória mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos extratos contra as linhagens de dermatófitos.

CIM 100 (µg/mL)						
EXT	TMATCC	TM5094	TM5419	TM6007	TM6085	TM7389
CP4	1000 - 2000	1000 - 2000	1000 - 2000	1000 - 2000	1000 - 2000	1000 - 2000
CS	2000 - 4000	2000 - 4000	2000	2000 - 4000	2000 - 4000	2000
CP4TM3	250 - 8000	250 - 8000	500 - 8000	250 - 8000	250 - 8000	250 - 8000
CP4TR1	2000 - 8000	4000 - 8000	4000 - 8000	4000 - 8000	4000 - 8000	4000 - 8000
TM3	1000 - 8000	2000 - 8000	1000 - 8000	1000 - 8000	1000 - 8000	1000 - 8000
TR1	2000 - 8000	2000 - 8000	4000 - 8000	4000 - 8000	4000 - 8000	4000 - 8000
CIM 100 (µg/mL)						
EXT	TRCBS	TR6185	TR6195	TR6284	TR7604	TR7984
CP4	500 - 2000	500 - 2000	500 - 2000	250 - 500	500 - 2000	250 - 2000
CS	1000 - 2000	2000	2000	500 - 2000	500 - 2000	2000
CP4TM3	250 - 8000	250 - 8000	250 - 8000	250 - 1000	500 - 8000	250 - 8000
CP4TR1	2000 - 4000	2000 - 8000	2000 - 4000	1000 - 2000	2000 - 4000	2000 - 4000
TM3	1000 - 4000	1000 - 8000	2000 - 8000	250 - 2000	1000 - 8000	250 - 4000
TR1	1000 - 4000	1000 - 8000	2000 - 8000	1000	2000 - 8000	1000 - 8000
CFM (µg/mL)						
EXT	TMATCC	TM5094	TM5419	TM6007	TM6085	TM7389
CP4	1000 - 2000	1000 - 2000	1000 - 2000	1000 - 2000	1000 - 2000	1000 - 2000
CS	2000 - 4000	2000 - 4000	2000 - 4000	2000 - 4000	2000	2000 - 4000
CP4TM3	500 - 8000	500 - 8000	500 - 8000	500 - 8000	1000 - 8000	500 - 8000
CP4TR1	4000 - 8000	4000 - 8000	4000 - 8000	4000 - 8000	4000 - 8000	4000 - 8000
TM3	1000 - 8000	2000 - 8000	2000 - 8000	1000 - 8000	1000 - 8000	1000 - 8000
TR1	2000 - 8000	4000 - 8000	4000 - 8000	4000 - 8000	4000 - 8000	4000 - 8000
CFM (µg/mL)						
EXT	TRCBS	TR6185	TR6195	TR6284	TR7604	TR7984
CP4	1000 - 2000	1000 - 2000	1000 - 2000	1000 - 2000	500 - 1000	500 - 2000
CS	2000	2000 - 4000	2000	1000 - 2000	2000	2000
CP4TM3	250 - 8000	250 - 8000	500 - 8000	500 - 4000	500 - 8000	500 - 8000
CP4TR1	2000 - 4000	2000 - 8000	2000 - 8000	2000	4000	2000 - 4000
TM3	1000 - 4000	1000 - 8000	2000 - 8000	1000 - 4000	2000 - 4000	1000 - 4000
TR1	1000 - 8000	2000 - 8000	2000 - 8000	1000 - 4000	4000 - 8000	2000 - 4000

No cálculo da média geométrica, de CIMs e CFMs, o extrato de CP4 foi o que apresentou melhor ação contra *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*, 885 e 1284 µg/mL, respectivamente. Os extratos de TM3 e CP4TM3 apresentam a segunda melhor ação com uma média geométrica de 1557 e 1577 µg/mL para CIMs. O menor desempenho de atividade antifúngica foi observado em CP4TR1 e TR1 com valores de 3035 e 2883 µg/mL para CIMs e 4157 µg/mL para CFMs (Tabela 4).

Tabela 4. Média geométrica dos valores de CIM e CFM dos extratos frente as linhagens de dermatófitos.

Média geométrica (µg/mL)						
	TR		TM		TR/TM	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
CP4	689	1212	1137	1361	885	1284
CS	1828	2000	2117	2619	1967	2289
CP4TM3	1414	1714	1759	2619	1577	2119
CP4TR1	2245	3429	4104	5040	3035	4157
TM3	1343	2245	1805	3299	1557	2722
TR1	2133	3429	3899	5040	2883	4157

6.3 Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das linhagens de *Candida* spp. frente ao fluconazol e extrato

Valores de CIM do fluconazol sobre espécies de *Candida* são descritas na tabela 4. As linhagens *C. albicans* e *C. parapsilosis* apresentaram valores entre 0.25 e 2 µg/mL. Nas linhagens de *C. auris*, é observado valor maior de CIM para a linhagem clínica (> 128 µg/mL) quando comparado a linhagem referência (8 µg/mL) (Tabela 5).

Tabela 5. Valores de concentração inibitória mínima (CIM) do fluconazol frente as espécies de *Candida* (CA: *C. albicans*; CP: *C. parapsilosis*; CAU: *C. auris*).

<i>C. albicans</i>	CIM (µg/mL)	<i>C. parapsilosis</i>	CIM (µg/mL)	<i>C. auris</i>	CIM (µg/mL)
CAATCC	1	CPATCC	0.5	CAUCBS	8
CA2	1	CP2	1	CAU2	> 128
CA3	1	CP3	1		
CA4	0.25	CP4	2		
CA5	0.25	CP5	1		
CA6	0.5	CP6	2		

A atividade antifúngica dos extratos contra as espécies de *Candida* mostrou valores de CIM entre 500 – 2000 µg/mL (Tabela 6). As linhagens de *C. parapsilosis* apresentaram maior sensibilidade quando comparado às linhagens de *C. albicans*. Em relação a CFM as linhagens de *C. albicans* e *C. parapsilosis* compreenderam valores de 2000 µg/mL. O maior valor de CFM foi observado para *C. auris* clínica (4000 µg/mL) e o menor para *C. auris* referência (500 µg/mL).

Tabela 6. Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do extrato de *C. parapsilosis* contra *Candida* spp.

	MIC (µg/mL)	MFC (µg/mL)		MIC (µg/mL)	MFC (µg/mL)		MIC (µg/mL)	MFC (µg/mL)
CAATCC	2000	2000	CPATCC	1000	2000	CAUCBS	500	500
CA2	2000	2000	CP2	1000	2000	CAU2	2000	4000
CA3	2000	2000	CP3	1000	2000			
CA4	2000	2000	CP4	1000	2000			
CA5	2000	2000	CP5	2000	2000			
CA6	2000	2000	CP6	2000	2000			

CA: *C. albicans*; CP: *C. parapsilosis*; CAU: *C. auris*.

No cálculo da média geométrica, valores maiores de CIM foram observados para *C. albicans* (2000 µg/mL), seguido por *C. parapsilosis* (1260 µg/mL) e *C. auris* (1000 µg/mL). Em relação a CFM, tanto *C. albicans* quanto *C. parapsilosis*, obtiveram maior média geométrica (2000 µg/mL), quando comparadas as linhagens de *C. auris* (1414 µg/mL) (Tabela 7).

Tabela 7. Média geométrica (MG) dos valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM).

	MG	
	CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)
CA	2000	2000
CP	1260	2000
CAU	1000	1414

CA: *C. albicans*; CP: *C. parapsilosis*; CAU: *C. auris*.

6.4 Ensaio *Checkerboard*

O ensaio *Checkerboard* foi realizado com os extratos CP4, CS, CP4TR1, CP4TM3, TR1, TM3 contra as linhagens TRCBS e TR7259. O ICIF avaliado para fluconazol e itraconazol indicam efeito combinatório predominantemente sinérgico entre os extratos e são elucidados na tabela 7. Valores de CIM para TRCBS do fluconazol, itraconazol e terbinafina, quando testados individualmente foram, respectivamente, 2, 0.25 e 0.05 µg/mL, enquanto a CIM dos extratos individualmente variou entre 500 – 8000 µg/mL. Entretanto, em associação, esses valores apresentaram redução: fluconazol 0.25 – 1 µg/mL; itraconazol 0.03 – 0.05 µg/mL e terbinafina 0.002 – 0.01. Essa tendência também se confirmou com os extratos, uma vez que o efeito combinatório variou de 1.9 – 125 µg/mL (Tabela 8).

Para a linhagem clínica TR7259, resistente aos fármacos testados, apenas para terbinafina não se observou efeito combinatório sinérgico. As CIMs individuais para fluconazol, itraconazol e terbinafina foram de 32, 0.5, 64 µg/mL. Para os extratos obtidos, as CIMs individuais dessa linhagem apresentaram valores maiores (2000 – 8000 µg/mL), quando comparadas a TRCBS. A associação entre os azóis e extratos apresentou redução dos CIMs (fluconazol 1 – 8 µg/mL, itraconazol 0.06 µg/mL; extratos 62.5 – 1000 µg/mL). Porém, na associação com terbinafina, valores de CIMs permaneceram os mesmos indicando efeito combinatório indiferente.

Com o cálculo do ICIF (Tabela 9), o menor valor obtido foi para a linhagem TRCBS com terbinafina (0.06 – 0.1). Itraconazol em associação com os extratos apresentou valores de ICIF semelhantes para as duas linhagens testadas (0.12 – 0.16). Para a combinação dos extratos com fluconazol, valores de ICIF contra TRCBS foram discretamente maiores (0.2 – 0.5) quando comparados à linhagem TR7259 (0.17 – 0.24). A associação de terbinafina e extratos contra TR7259 revelaram valores de ICIF igual a 2, indicando um efeito combinatório indiferente.

Tabela 8. Ensaio *Checkerboard*, redução nos valores de CIM.

TRCBS						TR7259							
Extratos	CIM FLC (µg/mL)	CIM EXT (µg/mL)	CIM Combinação (µg/mL)		ICIF	EC	Extratos	CIM FLC (µg/mL)	CIM EXT (µg/mL)	CIM Combinação (µg/mL)		ICIF	EC
			FLC	EXT						FLC	EXT		
CP4	2	500 - 2000	0.25 - 1	1.9 - 125	0.2	S	CP4	32	2000 - 4000	4	250	0.21	S
CS	2	2000	0.5 - 1	1.9 – 62.5	0.4		CS	32	> 4000	4	250	0.17	
CP4TR1	2	2000 - > 4000	1	3.9	0.5		CP4TR1	32	> 4000	4 - 8	500	0.24	
CP4TM3	2	2000 - > 4000	0.5 - 1	3.9 - 125	0.4		CP4TM3	32	> 4000	1 - 4	250 - 1000	0.12	
TR1	2	4000 - > 4000	0.25 - 1	3.9 – 31.2	0.3		TR1	32	4000 - > 4000	4	125 - 250	0.18	
TM3	2	2000 - > 4000	1	3.9	0.5		TM3	32	> 4000	4	126 - 250	0.17	
Extratos	CIM ITRA (µg/mL)	CIM EXT (µg/mL)	CIM Combinação (µg/mL)		ICIF	EC	Extratos	CIM ITRA (µg/mL)	CIM EXT (µg/mL)	CIM Combinação (µg/mL)		ICIF	EC
			ITRA	EXT						ITRA	EXT		
CP4	0.25	500 - 2000	0.03 – 0.05	1.9 – 62.5	0.13	S	CP4	0.5	2000 - 4000	0.06	62,5 - 250	0.13	S
CS	0.25	2000	0.03 – 0.05	1.9 – 62.5	0.12		CS	0.5	> 4000	0.06	250	0.12	
CP4TR1	0.25	2000 - > 4000	0.03 – 0.05	3.9 - 125	0.13		CP4TR1	0.5	> 4000	0.06	250	0.16	
CP4TM3	0.25	2000 - > 4000	0.03 – 0.05	3.9 – 31.2	0.12		CP4TM3	0.5	> 4000	0.06	125 - 1000	0.14	
TR1	0.25	4000 - > 4000	0.03 – 0.05	3.9 – 31.2	0.13		TR1	0.5	4000 - > 4000	0.06	125 - 31.2	0.12	
TM3	0.25	2000 - > 4000	0.03 – 0.05	3.9 – 31.2	0.12		TM3	0.5	> 4000	0.06	125	0.12	
Extratos	CIM TERB (µg/mL)	CIM EXT (µg/mL)	CIM Combinação (µg/mL)		ICIF	EC	Extratos	CIM TERB (µg/mL)	CIM EXT (µg/mL)	CIM Combinação (µg/mL)		ICIF	EC
			TERB	EXT						TERB	EXT		
CP4	0,02	500 - 2000	0.003 – 0.002	1.9	0.1	S	CP4	64	2000 - 4000	64	4000	2	I
CS	0,05	2000	0.01 - 0.002	3.9 – 1.9	0.04		CS	64	> 4000	64	> 4000	2	
CP4TR1	0,03	2000 - > 4000	0.01 – 0.002	3.9	0.13		CP4TR1	64	> 4000	16 - 64	4000 - > 4000	2	
CP4TM3	0,03	2000 - > 4000	0.01 – 0.002	3.9	0.06		CP4TM3	64	> 4000	64	4000 - > 4000	2	
TR1	0,05	4000 - > 4000	0.02 – 0.01	3.9	0.09		TR1	64	4000 - > 4000	32 - 64	2000 - > 4000	2	
TM3	0,03	2000 - > 4000	0.02 – 0.001	3.9	0.06		TM3	64	> 4000	64	> 4000	2	

CIM: Concentração inibitória mínima; EXT: extrato; FLC: fluconazol; ITRA; itraconazol; TERB: terbinafina; ICIF: Índice de Concentração inibitória fracionada; EC: efeito combinatório; S: sinérgico; I: indiferente)

Tabela 9. Média geométrica dos ICIFs obtidos, efeito combinatório predominante sinérgico (≤ 0.5)

	ICIF - Média Geométrica					
	TRCBS			TR7259		
	FLC	ITRA	TERB	FLC	ITRA	TERB
CP4	0.2	0.13	0.1	0.21	0.13	2
CS	0.4	0.12	0.04	0.17	0.12	2
CP4TR1	0.5	0.13	0.13	0.24	0.16	2
CP4TM3	0.4	0.12	0.06	0.12	0.14	2
TR1	0.3	0.13	0.09	0.18	0.12	2
TM3	0.5	0.12	0.06	0.17	0.12	2

ICIF: Índice de Concentração inibitória fracionada; FLC: fluconazol; ITRA; itraconazol; TERB: terbinafina.

6.5 Ensaio com Sorbitol e Ergosterol

Os valores de CIM dos extratos na presença do RPMI suplementado com sorbitol não apresentou alteração, tal fato sugere a não ação sobre a parede celular de TRCBS. Os valores de CEM (Concentração Efetiva Mínima) de caspofungina subiu de 0.2 $\mu\text{g/mL}$ para 1.3 $\mu\text{g/mL}$, comprovando a viabilidade da suplementação. Na presença do RPMI suplementado com ergosterol, valores de CIM dos extratos subiram em até 2x, quando comparados ao ensaio de RPMI sem suplementação, indicando ação sobre a membrana celular fúngica. Valores de CIM de anfotericina nesse ensaio subiram de 0.2 $\mu\text{g/mL}$ no meio sem ergosterol para 1.8 $\mu\text{g/mL}$ no meio suplementado (Tabela 10).

Tabela 10. Média geométrica dos valores de CIM dos extratos e fármacos na presença ou ausência de sorbitol - ergosterol

Ergosterol - TRCBS - CIM (µg/mL)				
Extratos	Meio não suplementado		Meio Suplementado	
	Anfotericina	Produto	Anfotericina	Produto
CP4	0.2	1260	1.3	3175
CS	0.2	2000	0.8	4000
CP4TR1	0.2	4000	0.6	5040
CP4TM3	0.3	6350	0.8	8000
TR1	0.2	2520	1.0	6350
TM3	0.3	4000	1.0	6350

Sorbitol - TRCBS – CIM/CEM (µg/mL)				
Extratos	Meio não suplementado		Meio Suplementado	
	Caspofungina	Produto	Caspofungina	Produto
CP4	0.2	1260	1.3	1260
CS	0.2	2000	1.3	2000
CP4TR1	0.2	4000	1.3	4000
CP4TM3	0.2	6350	1.3	6350
TR1	0.2	2520	1.3	2520
TM3	0.2	3175	1.3	3175

6.6 Ensaio de cinética de morte - *Time kill*

O ensaio de cinética de morte foi realizado ao longo de um período de 48 horas, com exposição das linhagens TRCBS, TR6185, TMatCC e TM5094 aos extratos CP4, CS, CP4TR1, CP4TM3, TM3 e TR1 na concentração de 4000 µg/mL. Gráficos foram traçados entre o número logarítmico de UFC/mL e o tempo (Gráfico 1 - 4).

Gráfico 1. Representação gráfica da cinética de morte de TRCBS em contato com os extratos.

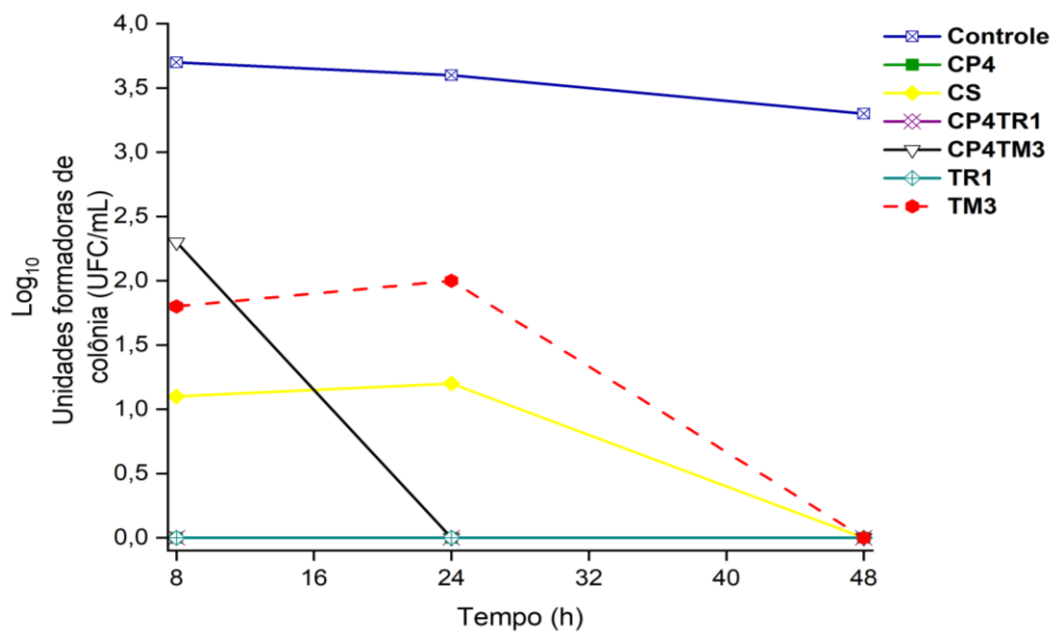


Gráfico 2. Representação gráfica da cinética de morte de TR6185 em contato com os extratos.

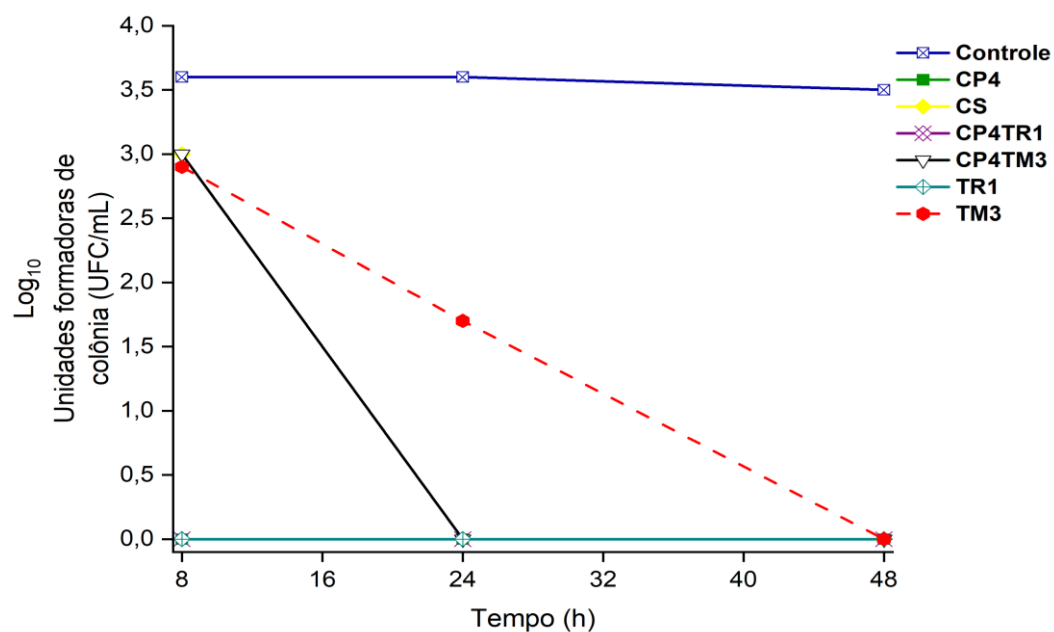


Gráfico 3. Representação gráfica da cinética de morte de TMatCC em contato com os extratos.

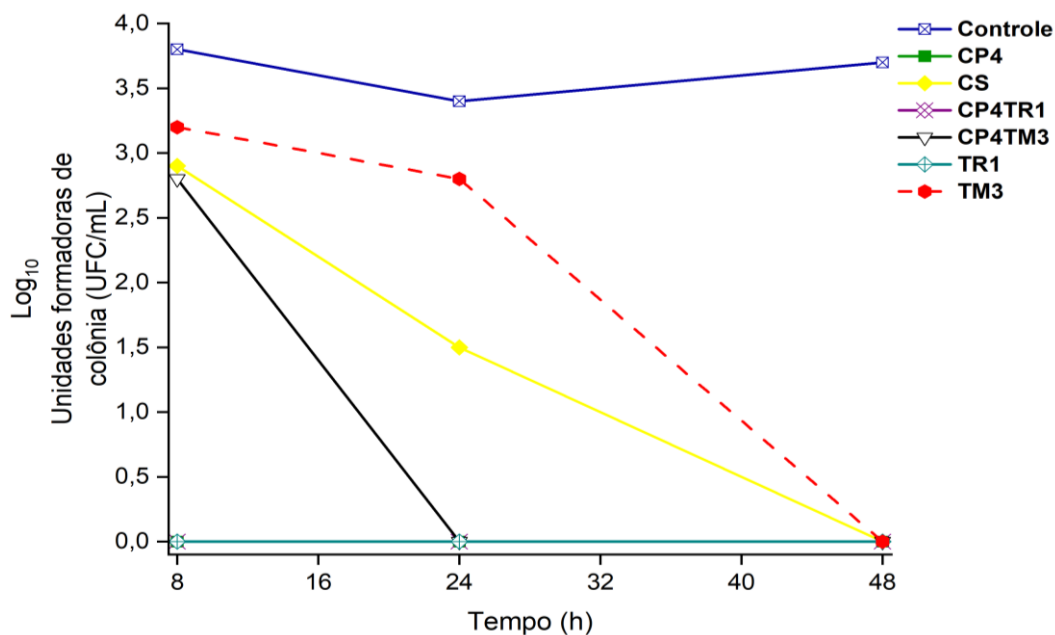
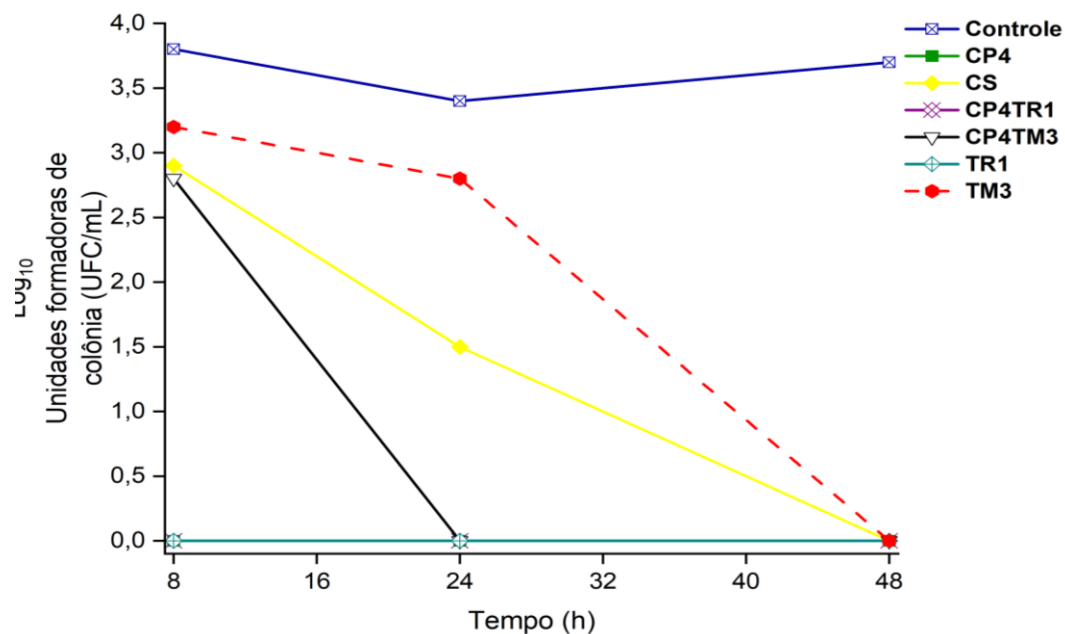


Gráfico 4. Representação gráfica da cinética de morte de TM5094 em contato com os extratos.



A redução máxima de UFC/mL para cepas de dermatófitos, foi observada em 48h, com taxa de inibição de 100%, em comparação ao controle de crescimento. Os extratos CP4, TR1, CP4TR1 apresentaram o tempo mais rápido

de redução para todas as linhagens de dermatófitos (8 horas), seguido por CP4TM3 (24 horas) (Tabela 11).

Tabela 11. Número de UFC/mL das linhagens de dermatófitos em exposição a diferentes tempos aos extratos.

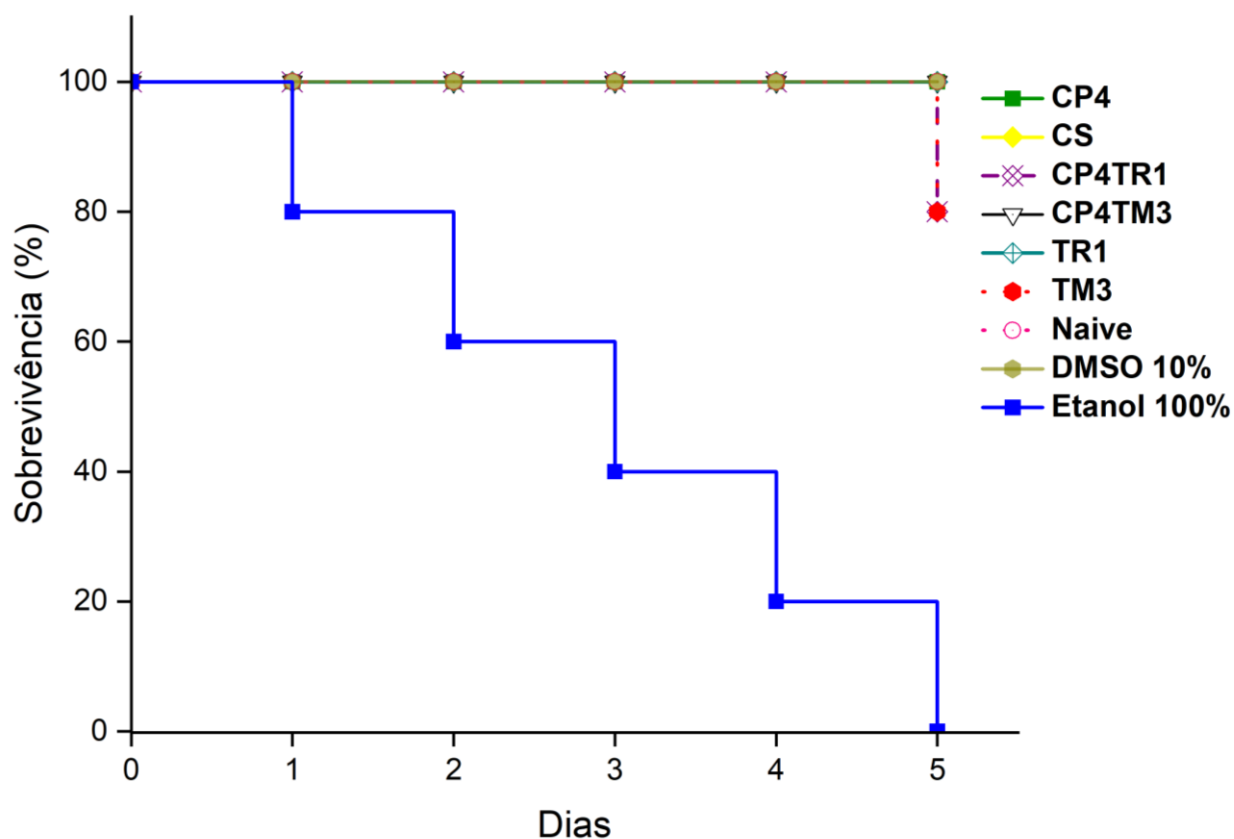
TRCBS				TR6185			
	8 horas	24 horas	48 horas		8 horas	24 horas	48 horas
CONTROLE	5083	3812	1955	CONTROLE	3957	4258	3450
CP4	0	0	0	CP4	0	0	0
CS	12	17	0	CS	949	0	0
CP4TR1	0	0	0	CP4TR1	0	0	0
CP4TM3	183	0	0	CP4TM3	1117	0	0
TR1	0	0	0	TR1	0	0	0
TM3	67	100	1	TM3	817	54	1

TMATCC				TM5094			
	8 horas	24 horas	48 horas		8 horas	24 horas	48 horas
CONTROLE	5173	5465	5217	CONTROLE	5971	2745	4753
CP4	0	0	0	CP4	0	0	0
CS	476	33	0	CS	842	33	0
CP4TR1	0	0	0	CP4TR1	0	0	0
CP4TM3	283	0	0	CP4TM3	667	0	0
TR1	0	0	0	TR1	0	0	0
TM3	1000	33	0	TM3	1533	633	0

6.7 Ensaio de toxicidade com *Galleria mellonella*

Os ensaios de toxicidade em *G. mellonella* evidenciam que extratos CP4, CS, TR1, CP4TM3 testados nas concentrações de 2000 µg/mL não foram tóxicos, permitindo sobrevivência de 100% das larvas injetadas. Para os extratos TM3 e CP4TR1 o índice de sobrevivência foi de 80% (Gráfico 5).

Gráfico 5. Representação da sobrevivência (%) das larvas de *Galleria mellonella* expostas aos extratos com monitoramento em intervalos de 24 horas durante um período de 5 dias.



6.7 Determinação do perfil químico dos extratos por infravermelho transformada de Fourier (FTIR)

O padrão espectral observado nos espectros médios pode ser separado em dois conjuntos de bandas de absorção: um conjunto que se repete em todas as amostras, a despeito de algumas variações, e, um outro, com maior variabilidade e especificidade por amostra (Gráficos 6 e 7). O primeiro conjunto inclui as bandas de média a alta intensidade em $3700 - 3100 \text{ cm}^{-1}$, $3100 - 2850 \text{ cm}^{-1}$ e $1710 - 1550 \text{ cm}^{-1}$ e, bandas de baixa intensidade em 1516 cm^{-1} , $750 - 745$ e $702 - 699 \text{ cm}^{-1}$. O segundo conjunto representa as demais bandas.

Gráfico 6. Espectros médios de reflexão total atenuada (ATR) de extratos com acetato de etila de amostras de caldos de cultura de *C. parapsilosis* e *Trichophyton* ssp. (A) espectros sobrepostos; (B) espectros escalonados.

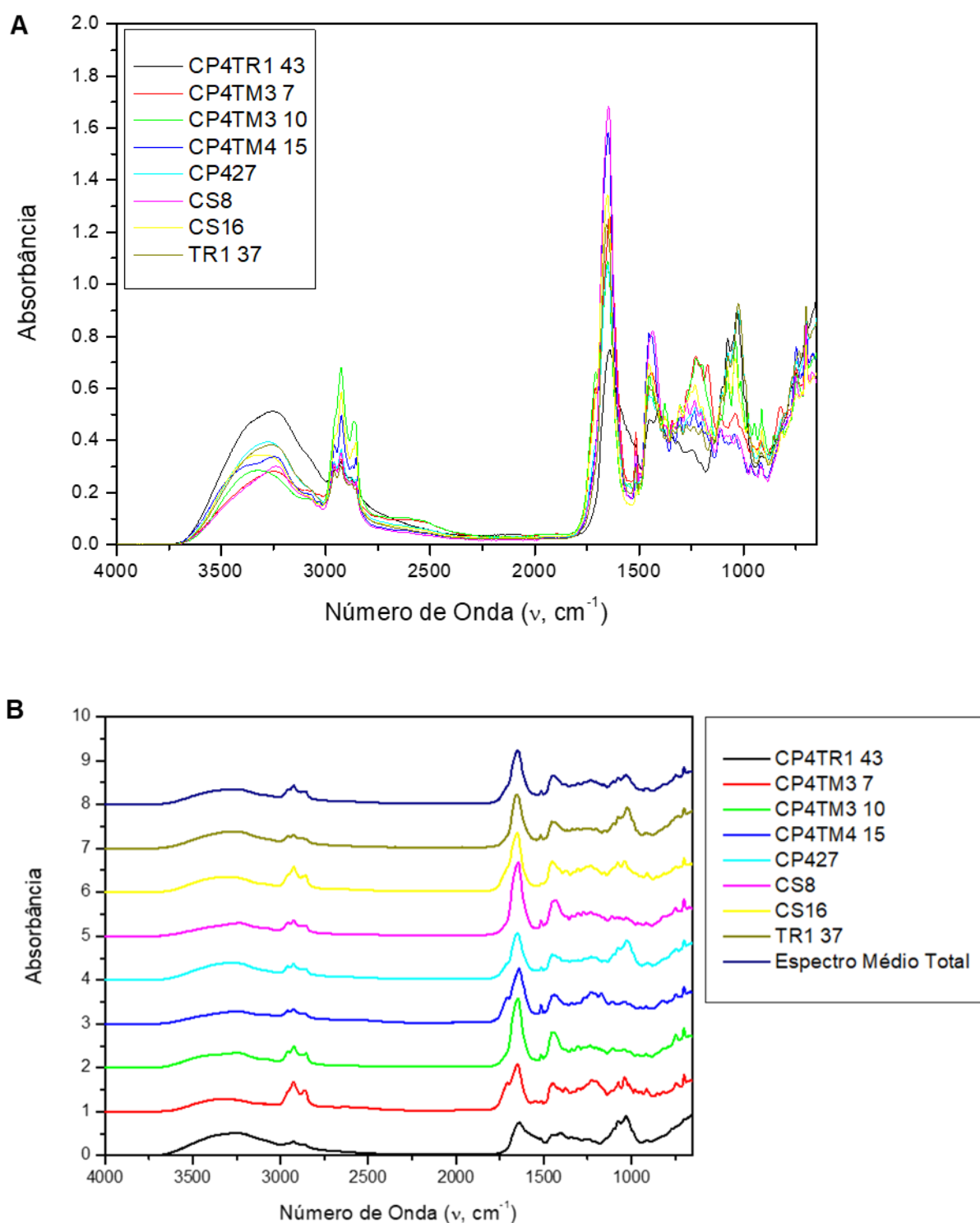
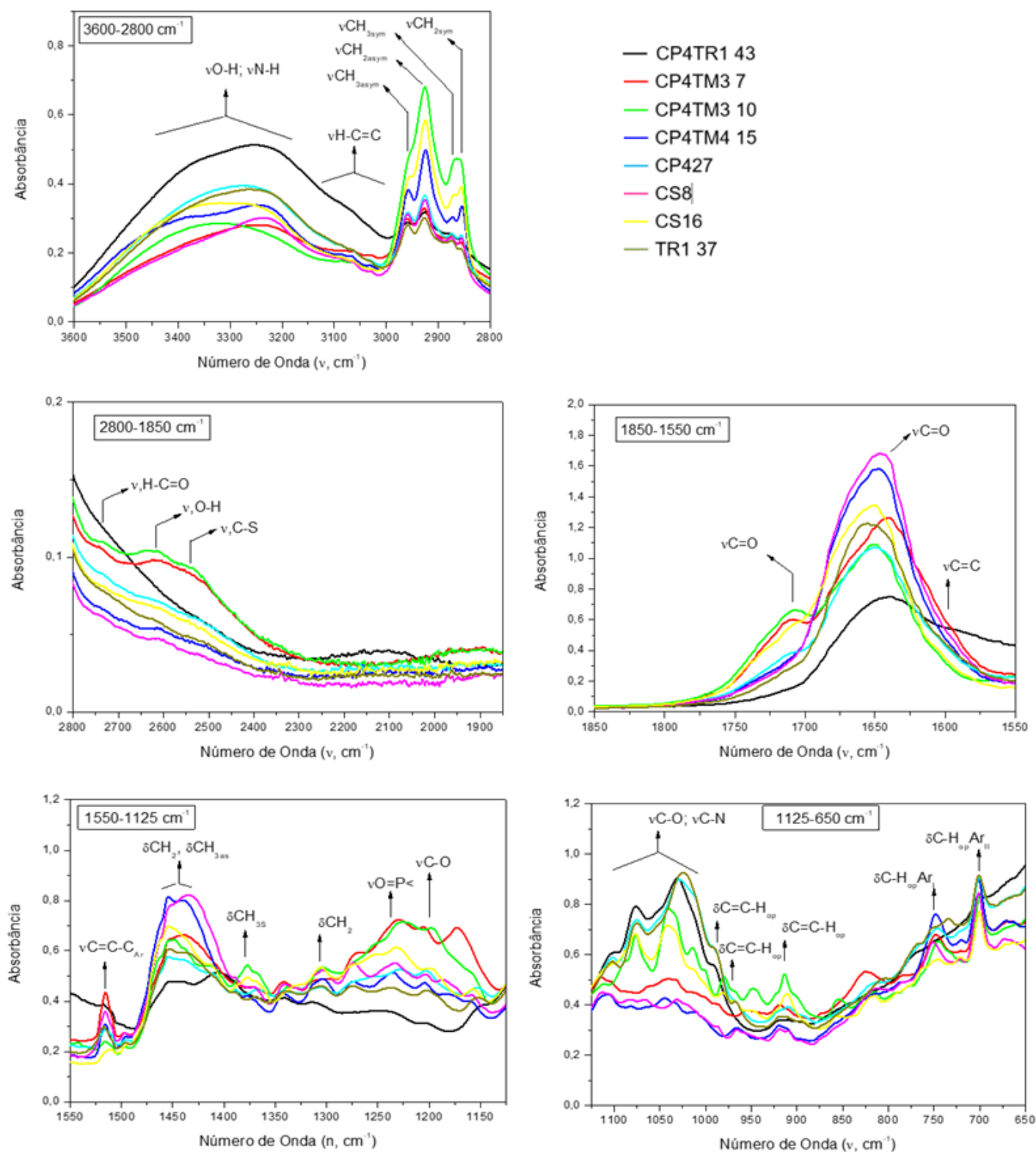


Gráfico 7. Regiões amplificadas de espectros FTIR/ATR médios dos extratos de culturas de *Candida parapsilosis* e *Trichophyton* spp.



Banda de média absorção, porém extensa, em 3700 - 3100 cm^{-1} , característica de deformação axial O-H, está presente em todas as amostras

com um máximo principal predominando entre 3254 - 3239 cm^{-1} , porém se estendendo até 3319 cm^{-1} . Amostra CP4TM4 15 tem 4 máximos de acessórios e CP4TM4 15 tem a maior área sob a curva de absorção.

Em 3100 - 2850 cm^{-1} observam-se deformações axiais de ligações C-H de grupos metila e metileno. Estas bandas reforçam a presença de cadeias alifáticas em todas as amostras, mas são mais intensas nas amostras CP4TM3 10, CS16 e CP4TM4 15, respectivamente. O máximo mais intenso ocorre em 2927 - 2924 cm^{-1} (ν C-H assimétrico de CH_2). A correlação entre números de onda destas absorções se correlaciona com $\nu = 1378 \text{ cm}^{-1}$ (δ C-H (CH_3) simétrica) com $R = 0.80$ a 0.82 reforçando a presença de cadeias alifáticas nos extratos. Apesar da forte intensidade de picos nesta região no espectro padrão de farnesol (Figura 10A), não há picos que se sobreponham a este espectro nas demais faixas espectrais das amostras

Bandas em 1700 - 1550 cm^{-1} , características de estiramentos axiais C=O, são mais intensas em CS8 e CP4TM4 15. Os máximos variaram entre 1651 - 1639 cm^{-1} . Esta absorção está relacionada à função carbonila conjugada à ligação dupla como aquela presente em compostos quinônicos (Figura 10G), mas pode estar relacionada também a aldeídos e ácidos carboxílicos α,β -insaturados alifáticos ou ligados a anéis aromáticos. Os números de onda desta faixa apresentam alta correlação ($R = 0.96$ - 0.99) com as absorções da faixa de 1452 a 1432 cm^{-1} . Esta região inclui movimentos angulares de grupos metila e metilênicos e apresenta grande variabilidade no perfil espectral entre as amostras e são intensas apenas em CP4TM4 15 e CS8. A presença de compostos quinônicos poderia explicar a cor castanha observada nos extratos.

Uma segunda absorção ν C=O com máximos em 1708 - 1707 cm^{-1} está presente em maior intensidade em CP4TM3 7 e CP4TM3 10, e em menor intensidade (expressa como ombro) em CS16, CP427 e TRI 37, estando ausente nas demais. Esta absorção se sobrepõe a absorções de ácidos carboxílicos como ácidos graxos livres (Figura 10F). Não se identificam, nesta região espectral, as absorções ν C=O de triacilgliceróis ou de ésteres alifáticos saturados de outra natureza (faixa de 1750 - 1730 cm^{-1}), passíveis de serem extraídos por acetato de etila. Também não se identifica a absorção ν C=O de aldeído saturado (1740 - 1725 cm^{-1}), que poderiam estar presentes como

fenilacetaldéido (Figura 10C), 4-hidroxifenilcetaldeído ou indoalcetaldeído, precursores das moléculas fúngicas *quorum-sensing* 2-fenil etanol (Figura 10A), tirosol ou triptofol, respectivamente.

A ausência de banda de amida II ou de absorção simples de movimento angular de amina primária ou secundária alifática (δ -N-H) individualizada em 1549 - 1545 exclui a possibilidade de esfingolipídios (ceramida, esfingosina 1 fosfato, esfingosina, ceramida 1-fosfato, di-hidroceramida, galactosilceramida, lactosilceramida, glicosilceramida) eventualmente extraídos por acetato de etila em culturas de leveduras. A ausência de função éster ($1750 - 1730 \text{ cm}^{-1}$) reforça esta afirmação. Se por ventura estiverem presentes, ocorrem em quantidades reduzidas, não detectáveis por FTIR/ATR nas condições utilizadas.

Uma banda de baixa intensidade em 1516 cm^{-1} está fortemente correlacionada com ombro em 1599 cm^{-1} ($R=0.967$) e formam um conjunto de bandas atribuídas a movimento do esqueleto de carbono de anéis aromáticos simples.

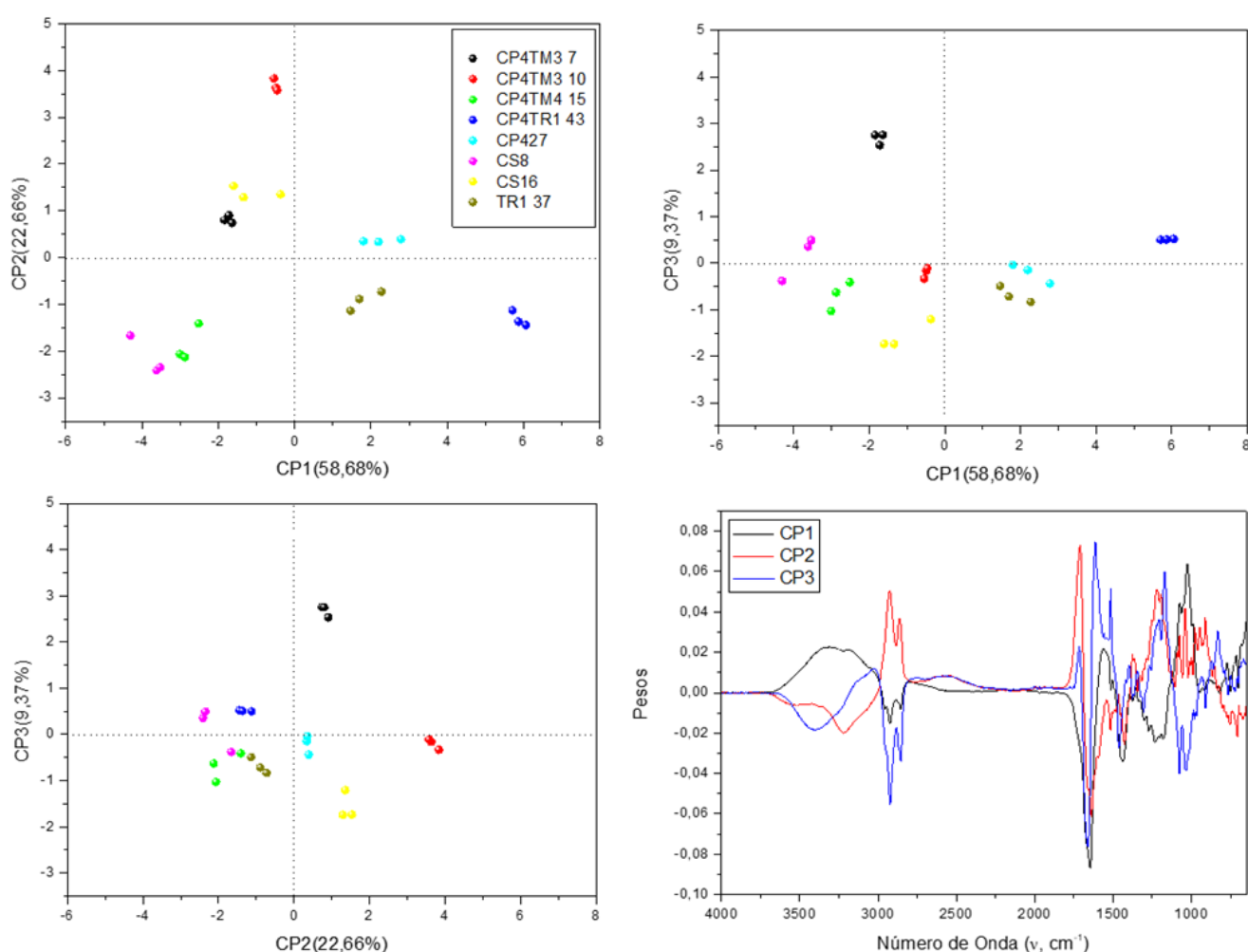
Bandas referentes a movimentos angulares C-H fora do plano de sistemas aromáticos (δ C-H_{op}Ar I e II) com máximos em $750 - 745 \text{ cm}^{-1}$ e $702 - 699 \text{ cm}^{-1}$, respectivamente, estão correlacionadas ($R=0.91$, $A_{747}XA_{702}$) e contribuem para a presença de compostos aromáticos monossustituídos. Há sobreposição com as respectivas bandas do espectro FTIR padrão de 2-feniletanol.

Por fim, observa-se uma diversidade no perfil espectral na região de *fingerprint* entre 1350 a 900 cm^{-1} onde predominam absorções de estiramento axial de ligações C-O e C-N e movimentos da estrutura de anéis aromáticos simples.

O conjunto de dados espectrais está bem representado nas primeiras cinco CPs as quais traduzem 98.56% da variância original (CP1 = 58.68%; CP2 = 22.66%; CP3 = 9.37%; CP4 = 6.04%; CP5 = 1.60%). CP1 separa as amostras CP427, CP4TR1 e TR1 37 das demais. A separação está associada aos pesos positivos de absorções ν O-H e ν C-O (correlacionadas) e presentes em maior intensidade nas primeiras amostras. Por outro lado, a presença de absorções ν C=O em $1651 - 1639 \text{ cm}^{-1}$ contribui negativamente para a separação, deslocando as amostras com esta característica para o semieixo negativo de CP1.

CP2 separa CP4TM3 10, CP4TM3 7, CS16 e CP427 das demais. O gráfico de pesos mostra que esta separação está associada a contribuições positivas de movimentos associados a cadeias alifáticas e deformação axial de C=O em $1705 - 1702 \text{ cm}^{-1}$ correlacionados e que predominam nos espectros das amostras posicionadas em relação ao semieixo positivo de CP2. Novamente, à semelhança de CP1, a presença de absorções $\nu\text{C=O}$ em $1651 - 1639 \text{ cm}^{-1}$ contribui negativamente para a separação deslocando as amostras com esta característica para o semieixo negativo de CP2. Observa-se, compostos com diferentes padrões de absorção $\nu\text{C=O}$ entre as amostras (Gráfico 8).

Gráfico 8. Gráficos CP1xCP2, CP1xCP3 e CP2xCP3 e respectivos pesos das variáveis de três primeiras CPs, referente às triplicatas de espectros FTIR/ATR, de extratos de cultura de *C. parapsilosis* e *Trichophyton* spp.



O perfil químico dos extratos determinado pela técnica de FTIR/ATR, aponta para a presença de moléculas de pequeno tamanho com cadeias alifáticas e anéis aromáticos, contendo funções oxigenadas como álcoois e ácidos carboxílicos e, possivelmente cetonas alfa-beta-insaturadas.

REFERÊNCIAS

ALBERDI, E; GÓMEZ, C. Methylene blue vs methyl aminolevulinate photodynamic therapy in the treatment of mild-to-moderate toenail onychomycosis: Short- and medium-term effects. **Dermatologic Therapy**, v. 33, n. 6, e14280, 2020.

ANDRÉS, T. S.; ALEXANDRO, B. Candida Onychomycosis: an Old Problem in Modern Times. **Current Fungal Infection Reports**, v. 14, n. 3, p. 209–216, 2020.

APPELT, L et al. Terbinafin-resistente Dermatophytosen und Onychomykose durch *Trichophyton rubrum* [Terbinafine-resistant dermatophytoses and onychomycosis due to *Trichophyton rubrum*]. **Hautarzt**, v. 72, n. 10, p. 868-877, 2021.

BABAYANI, M et al. Onychomycosis due to dermatophytes species in Iran: Prevalence rates, causative agents, predisposing factors and diagnosis based on microscopic morphometric findings. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 28, n. 1, p. 45-50, 2018.

BEUSCHER, T L; KELECHI, T J. Onychomycosis Diagnosis, Treatment, and Prevention. **Journal of Wound, Ostomy, and Continence Nursing**, v. 46, n. 4, p. 333-335, 2019.

BODMAN, M A, KRISHNAMURTHY, K. Onychomycosis. [Updated 2022 May 1]. In: StatPearls [Internet]. **Treasure Island (FL): StatPearls Publishing**, 2022.

BRESCINI, L et al. Antifungal Combinations in Dermatophytes. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 9, p. 727, 2021.

CAMPOY, S; ADRIO, J L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, v. 1, n. 133, p. 86-96, 2017.

CASTRO, R D et al. Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the

oral cavity: an in vitro study. **BMC Complementary and Alternative Medicine.**, v. 15, p. 1-7, 2015.

CLSI. M38- 3rd. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard — Third Edition. **Clinical and Laboratory Standard Institute**, 2017a.

CLSI. M27 – ed4. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Standard — 4th Edition. **Clinical and Laboratory Standard Institute**, 2017b.

COATES, J. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, 2006.

DE BERKER, D. Nail anatomy. **Clinics in Dermatology**, v. 31, n. 5, p. 509–515, 2013.

DOĞAN, İ S. New azole derivatives showing antimicrobial effects and their mechanism of antifungal activity by molecular modeling studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 130, p. 124-138, 2017.

FARAMARZI, B et al. A Brief Review of FTIR Spectroscopy Studies of Sphingolipids in Human Cells. **Biophysica**, v. 3, p. 158–180, 2023.

FICH, F et al. *Candida parapsilosis* and *Candida guilliermondii*: emerging pathogens in nail candidiasis. **Indian Journal of Dermatology**, v. 59, n. 1, p. 24-29, 2019.

GAURAV, V et al. Terbinafine resistance in dermatophytes: Time to revisit alternate antifungal therapy. **Journal of Medical Mycology**, v. 31, n. 1, p. 101087, 2021.

GAUTAM, M et al. Comparative evaluation of potassium hydroxide mount, fungal culture, and histopathology of nail clipping with periodic acid–Schiff stain in the

diagnosis of onychomycosis. **Indian Journal of Dermatopathology and Diagnostic Dermatology**, v. 8, n.1, p. 6 – 12, 2021.

GE, G et al. Onychomycosis with greenish-black discolorations and recurrent onycholysis caused by *Candida parapsilosis*, **Medical Mycology Case Reports**, v. 24, p. 48-50, 2019.

GEINGUENAUD, F; MILITELLO, V; ARLUISON, V. (2020). Application of FTIR Spectroscopy to Analyze RNA Structure. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 2113, p. 119 – 133, 2020.

GÓMEZ-SÁENZ, A; ARENAS, R. Mixed Onychomycosis. A Case Report Caused by *Trichophyton rubrum*, *Fusarium sp.* and *Candida albicans*. **Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica**, v. 18, n. 1, p. 48 – 50, 2020.

GONZÁLEZ-SERVA, A. Scher and daniel's nails. **Springer International Publishing**, ed. 4, p. 38-82, 2018.

GREGORIOU, S et al. Epidemiology of Onychomycosis in an Academic Nail Unit in South Greece during a Three-Year Period. **Skin Appendage Disorders**, v. 6, n. 2, p. 102–107, 2020.

GUPTA, A K; MAYS, R R. The impact of onychomycosis on quality of life: a systematic review of the available literature. **Skin Appendage Disorders**, v. 4(4), p. 208-216, 2018.

GUPTA, A K et al. Onychomycosis in the 21st Century: An Update on Diagnosis, Epidemiology, and Treatment. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 21, n. 6, p. 525-539, 2017.

GUPTA, A K et al. High prevalence of mixed infections in global onychomycosis. **PLoS ONE**, v. 15, n. 9 September, p. 1–8, 2020a.

GUPTA, A K et al. Onychomycosis: a review. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 34, n. 9, p. 1972–1990, 5 set. 2020b.

GUPTA, A K; STEC, N. Recent advances in therapies for onychomycosis and its management. **F1000Research**, v. 25, n. 8, F1000 Faculty Rev-968, 2019.

GUPTA, A K et al. Diagnosing Onychomycosis: What's New? **Journal of Fungi (Basel)**, v. 29, n.8(5), p. 464, 2022.

IGNASIAK, K; MAXWELL, A. *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. **BMC Research Notes**, v. 29, n. 10(1), p. 428, 2017.

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

KLEPSEK, M et al. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. **Antimicrobials Agents and Chemotherapy**, v. 42, n., p. 1207 - 1212, 1998.

KUMAR, S N et al. Activity and synergistic interactions of stilbenes and antibiotic combinations against bacteria *in vitro*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 11, p. 3143–3150, 2012.

LAVORATO, F G et al. Performance of mycology and histopathology tests for the diagnosis of toenail onychomycosis due to filamentous fungi: Dermatophyte and non-dermatophyte moulds. **Mycoses**, v. 60, n. 9, p. 587-593, 2017.

LECERF, P et al. Direct examination, histopathology and fungal culture for the diagnosis of onychomycosis: A retrospective, comparative study on 2245 specimens. **Mycoses**, v. 64, n.2, p. 187-193, 2021.

LEUNG, A K C et al. Onychomycosis: An Updated Review. **Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery**, v. 14, n. 1, p. 32–45, 18 nov. 2019.

LEMES, T H et al. O estudo da interferência biológica entre dermatófitos e leveduras em onicomicoses. **International Journal of Health Science - PDVS**, v. 1, p. 75-86, 2021a.

LEMES, T H et al. *In vitro* antifungal activity of *Candida* culture extracts against *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. **Brazilian Journal of Case Reports**, v. 1, n. 4, p. 135 – 152, 2021b.

LIM, S. Diagnosis of Onychomycosis: From Conventional Techniques and Dermoscopy to Artificial Intelligence. **Frontiers in Medicine**, v. 8, 2021.

LIMA, C A. **Caracterização bioquímica de lesões neoplásicas via estreptosopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier**. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear – Materiais) – IPEN Autarquia Associada à Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 8, 2015.

LIPNER, S R et al. Therapeutic Recommendations for the Treatment of Toenail Onychomycosis in the US. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 20, n. 10, p. 1076–1084, 2021.

LIPNER, S R; SCHER, R. K. Onychomycosis: Clinical overview and diagnosis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 80, n. 4, p. 835-851 2019.

MA, W et al. Laser treatment for onychomycosis: A systematic review and meta-analysis. **Medicine (Baltimore)**, v. 98, n. 48, e17948, 2019.

MARTINEZ-ROSSI, N M. State-of-the-Art Dermatophyte Infections: Epidemiology Aspects, Pathophysiology, and Resistance Mechanisms. **Journal of Fungi (Basel)**, v. 3, n. 7(8), p. 629, 2021.

MAXFIELD, L et al. Terbinafine. In: StatPearls [Internet]. **Treasure Island (FL): StatPearls Publishing**, 2022.

MESINI, A et al. Changing epidemiology of candidaemia: Increase in fluconazole-resistant *Candida parapsilosis*. **Mycoses**, v. 63, n. 4, p. 361-368, 2020.

MOHAMMADI, F et al. Relationship between antifungal susceptibility profile and virulence factors in *Candida albicans* isolated from nail specimens. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 7, n. 53, e20190214, 2020.

MONIKA, S. Virulence factors in *Candida* species. **Current Protein & Peptide Science**, v. 21, p. 313–323, 2019.

MONOD, M; MÉHUL, B. Recent Findings in Onychomycosis and Their Application for Appropriate Treatment. **Journal of Fungi (Basel)**, v. 22, n. 5(1), p. 2, 2019.

MORGADO, L F et al. Photodynamic Therapy treatment of onychomycosis with Aluminium-Phthalocyanine Chloride nanoemulsions: A proof of concept clinical trial. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 173, p. 266-270, 2017.

MOTAMEDI, M et al. Growing incidence of nondermatohyte onychomycosis in Tehran, Iran. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v.9, n.8, 2016.

NADA, E et al. A Diagnosis of onychomycosis clinically by nail dermoscopy versus microbiological diagnosis. **Archives of Dermatological Research**, v. 312, n. 3, p. 207-212, 2020.

NIST OFFICE OF DATA; INFORMATICS. Welcome to the NIST WebBook. Disponível em: <<https://webbook.nist.gov>>. Acesso em: 26 maio. 2023.

OLIVER, J et al. Metabolic profiling of *Candida* clinical isolates of different species and infection sources. **Science Report**, v. 7, n. 10(1), 16716, 2020.

PAKSHIR, K. Molecular characterization and antifungal activity against non-dermatophyte molds causing onychomycosis. **Science Report**, v. 20, n. 11(1):20736, 2021.

PAŠKEVIČIUS, A et al. *Candida* distribution in onychomycosis and in vitro susceptibility to antifungal agents. **Acta Dermatovenereol Croatica**, v. 28, n. 7, p. 204-209, 2020.

PETRUCELLI, M F et al. Diagnostic Perspectives of Dermatophytoses. **Journal of Fungi (Basel)**, v. 23, n.6(4), p. 310, 2020.

PHAITONWATTANAKIJ, S et al. Predisposing factors, clinical features and treatment outcomes of *Fusarium* onychomycosis and comparison of its characteristics with *Neoscytalidium* onychomycosis. **Journal of Medical Mycology**, v. 31, n. 3, 101165, 2021.

PIRACCINI, B; ALESSANDRINI, A. Onychomycosis: A Review. **Journal of Fungi**, v. 1, n. 1, p. 30–43, 2015.

RATHER, S et al. Candidal onychomycosis: Clinicoepidemiological profile, prevailing strains, and antifungal susceptibility pattern-a study from a tertiary care hospital. **Indian Journal of Dermatology**, v. 66, n. 2, p. 132–137, 2021.

REINEL, D. Non-dermatophyte fungi in onychomycosis—Epidemiology and consequences for clinical practice. **Mycoses**, v. 64, p. 694–700, 2021.

SARDANA K et al. Immunopathogenesis of Dermatophytoses and Factors Leading to Recalcitrant Infections. **Indian Dermatology Online Journal**, v. 12, n. 12(3), p. 389-399, 2021.

SAEEDI, P; SHAVANDI, A; MEREDITH-JONES, K. Nail Properties and bone health: a review. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 9, n. 2, p. 31, 2018.

SHAFIEI, M et al. History of the development of antifungal azoles: a review on structures, sar, and mechanism of action. **Bioorganic Chemistry**, v. 104, 104240, 2020.

SHEMER, A et al. Clinical significance of *Candida* isolation from dystrophic fingernails. **Mycoses**, n. 63, p. 964– 969, 2020.

SHEN, J J. Photodynamic therapy treatment of superficial fungal infections: A systematic review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 31, 101774, 2020.

SHEN J J et al. The emerging terbinafine-resistant Trichophyton epidemic: What Is the Role of Antifungal Susceptibility Testing? **Dermatology**, v. 238, n. 1, p. 60 - 79, 2022.

SIGURGEIRSSON, B; BARAN, R. The prevalence of onychomycosis in the global population? A literature study. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 28, n. 11, 2014.

SILVA, S et al. Antifungal sensitivity profile of clinical isolates obtained from onychomycosis to conventional antifungals. **Research, Society and Development, [S. I.]**, v. 9, n. 8, p. e561985775, 2020.

SONTHALIA, S; GOLDUST, M. Innovative Physical Approaches for Onychomycosis: Peeling, Lasers and Beyond. **Skin Appendage Disorders**, v. 5, n. 4, p. 197-200, 2019.

TALAPKO, J et al. *Candida albicans* – the virulence factors and clinical manifestations of infection. **Journal of Fungi (Basel)**, v. 7, n. 2, p. 79, 2021.

TAMER, F; YUKSEL, M E. Onychomycosis due to mixed infection with non-dermatophyte molds and yeasts. **Our Dermatology Online**, v. 10, n. 3, p. 267– 269, 2019.

TKACHENKO, Y; NIEDZIELSKI, P. FTIR as a Method for Qualitative Assessment of Solid Samples in Geochemical Research: A Review. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 24, p. 8846, 2020.

TIAN, X. *Quorum Sensing* in Fungal Species. **Annual Review of Microbiology**, v. 8, n. 75, p. 449-469, 2021.

TROVATO, L et al. Use of real time multiplex PCR for the diagnosis of dermatophytes onychomycosis in patients with empirical antifungal treatments. **Journal of Infection and Public Health**, v. 15, n. 5, 2022.

VELASQUEZ-AGUDELO V; CARDONA-ARIAS J A. Meta-analysis of the utility of culture, biopsy, and direct KOH examination for the diagnosis of onychomycosis. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 166, 2017.

WATANABE, S; ISHIDA, K. Molecular Diagnostic Techniques for Onychomycosis: Validity and Potential Application. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 18, n. 2, p. 281-286, 2017.

YANG, Y L et al. Adverse effects associated with currently commonly used antifungal agents: a network meta-analysis and systematic review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 29, n. 12, p. 697330, 2021.

YOUSSEF, A et al. Onychomycosis: Which fungal species are involved? Experience of the Laboratory of Parasitology-Myiology of the Rabta Hospital of Tunis. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 28, n. 4, p. 651-654, 2018.

ZALACAIN, A et al. Clinical laser treatment of toenail onychomycoses. **Lasers in Medical Science**, v. 33, n. 4, p. 927-933, 2018.

ZHANG, J et al. Efficacy of laser therapy combined with topical antifungal agents for onychomycosis: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. **Lasers in Medical Science**, v. 37, n. 6, p. 2557-2569, 2022.

7. ARTIGO I

Combinatorial effect of fluconazole, itraconazole, and terbinafine with different culture extracts of *Candida parapsilosis* and *Trichophyton* spp. against *Trichophyton rubrum*

Thiago Henrique Lemes¹, Julyanna Andrade Silva Nascentes¹, Luis Octávio Regasini¹, João Paulo Zen Siqueira², Taiza Maschio-Lima¹, Veridianna Camilo Pattini¹, Mariela Domiciano Ribeiro², Bianca Gottardo de Almeida¹, Margarete Teresa Gottardo de Almeida².

Affiliations:

¹São Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences, São José do Rio Preto, Brazil.

²São José do Rio Preto School of Medicine (FAMERP), Dept. of Dermatological, Infectious, and Parasitic Diseases São José do Rio Preto, Brazil.

Corresponding author:

Thiago Henrique Lemes

e-mail: lemes_th@outlook.com

Orcid: 0000-0002-7906-1337

Key-words: Onychomycosis: Synergism: *Candida* spp.: *Trichophyton* spp: Antifungals drugs.

Artigo submetido para a Revista International Microbiology. P- ISSN 11396709.

Submission ID: 8a90b385-1f8b-43ce-99a7-451159b43da2

Abstract: Onychomycosis is a nail infection caused by dermatophytes, non-dermatophytes, and yeasts, especially *Candida* species. The present study evaluated the combinatorial effect of different cultured extracts of *Candida parapsilosis* and *Trichophyton* spp. with fluconazole, itraconazole, and terbinafine against clinical isolates of *Trichophyton rubrum*. In addition, investigation of the action of the extracts on the wall or membrane was performed. Pure and mixed cultures of *Candida parapsilosis* and dermatophytes were filtered through a 0.2 µm membrane and submitted to liquid-liquid extraction using ethyl acetate. After a checkerboard trial with drugs was performed to evaluate the synergistic interaction with the extract. The results obtained for the minimum inhibitory concentration (MIC) of extracts against the *T. rubrum* strain in isolation were 500 - 8000 µg/mL. The MIC range for fluconazole, itraconazole and terbinafine were 2-32 µg/mL, 0.25 – 0.5 µg/mL, 0.03 - 64 µg/mL, respectively. However, when the extract was combined with drugs, the MIC values decreased: extracts 1.9 - 1000 µg/mL, fluconazole 0.25 – 4, itraconazole 0.03 – 0.06 µg/mL, and terbinafine 0.001 – 0.02 µg/mL. The MIC values of the extracts in the RPMI supplemented with sorbitol did not change, suggesting any action on the cell wall. However, in the presence of RPMI supplemented with ergosterol, MIC values of the extracts increased by up to 2x, indicating action on the fungal cell membrane. A synergistic action was observed between products and drugs, detecting a decrease in MIC values. There is potential and a new therapeutic perspective for fungal control.

Introduction: Dermatophytes are highly specialized fungi capable of degrading keratinized tissues such as skin, nails, and hair. They are the main etiological agents of onychomycosis, nail infections that affect up to 5 – 14% of the world population, characterized by discoloration, hyperkeratosis, and, in some cases, destruction of the nail apparatus (Leung et al. 2020). The species *Trichophyton rubrum* is the primary agent. However, yeasts of the genus *Candida* stand out as the cause of nail infections (Veiga et al. 2022). The treatment consists of topical antifungals, systemic, or a combination of both, having as the primary target the membrane and cell wall constituents. The available and therapeutically adopted drugs are fluconazole, itraconazole, and terbinafine (Khurana et al. 2019). However, recalcitrant infections have become challenging for controlling onychomycosis since resistance to antifungal agents is the typical phenotype (Gupta et al. 2018 a, b). Therefore, the search for new control alternatives for new constituents or pharmaceutical combinations has gained considerable scientific interest over the years (Brescini et al. 2021). The present study aimed to evaluate the combinatorial effect of extracts of pure and mixed cultures of *Candida parapsilosis*, *Trichophyton rubrum*, and *Trichophyton mentagrophytes* with fluconazole, itraconazole, and terbinafine against *Trichophyton rubrum*.

Methods

Microorganisms: For this study, strains of *Candida parapsilosis*, *Trichophyton mentagrophytes*, and *Trichophyton rubrum* of the Microbiology Laboratory of the Faculty of Medicine of São José do Rio Preto – FAMERP, São Paulo, Brazil, and of the Centraal bureau Voor Schimmelcultures (*T. rubrum* 118892 - CBS) were used. All isolates were registered in the National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SisGen) under protocol number AF41CDD.

Extracts: For the preparation of the culture extracts, colonies of *C. parapsilosis* growth on Sabouraud Agar with incubation at 35° C for 24 hours were inoculated in 500 mL of Sabouraud Dextrose Broth (CSD), with turbidity corresponding to MacFarland scale ten and incubated at 35°C for 72 hours. For the *Trichophyton* spp. (TM, TR), seven-day-old cultures on Potato Dextrose Agar were covered with sterile saline, and the mixture of conidia and hyphae was transferred to 500 mL of CSD and incubated at 35°C for 120 hours. To prepare mixed culture extracts (CP+TM/CP+TR), 5mL of the inoculum described above was transferred to 500 mL of CSD and incubated at 35° C for 120 hours.

The culture media containing the inoculum were filtered through a 0.2 µm Millipore membrane and submitted to liquid-liquid extraction, using ethyl acetate as a counter-phase. The procedure was repeated three times, allowing the total extraction of fungal metabolites from the culture media. The ethyl acetate phase was subjected to a rotary evaporator for drying. The resulting mass compound was solubilized in a sterile distilled water solution with 10% dimethyl sulfoxide (DMSO).

Susceptibility profile of *T. rubrum* strains for extracts, fluconazole, itraconazole, and terbinafine: The antimicrobial susceptibility profile of *T. rubrum* strains against commercial antifungal agents and extracts was determined by the microdilution technique according to the protocol described in document M38-3rd of the Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI 2017a). For the preparation of the inoculum dermatophyte strains were cultured on Potato Dextrose Agar at 35°C for seven days. The inoculum was adjusted in a spectrophotometer reading at 530 nm, followed by dilution at 1:50 in RPMI – 1640 medium (Rosen Park Media Institute), with a final concentration of 0.4 to 5×10^4 cells/mL. Subsequently, 0.1 mL of the inoculum suspension was inoculated into 96-well polystyrene plates containing RPMI-1640 medium at different concentrations of the drugs to be tested. Sterility control wells (containing 0.2 mL of RPMI) and growth controls (containing inoculum and RPMI only) were prepared. Plates were incubated at 35°C for 120 hours. The MIC of the drugs for fluconazole, itraconazole, was determined as the lowest concentration capable of inhibiting 80% (MIC80). For extracts and terbinafine, 100% (MIC100) of fungal growth.

Checkerboard assay: The combinatorial effect between the fungal extracts with antifungals was performed using the checkerboard assay (based on the M27-Ed4 2017 protocol, with modifications) (CLSI 2017b). The recommendations mentioned in the previous item were followed for the inoculum preparation. All microplates (96 wells) were filled with 100µL of RPMI. Drugs were added and diluted in their respective concentrations: itraconazole 4 - 0.06 µg/mL, fluconazole, and terbinafine 64 – 0.001 µg/mL. Subsequently, the extracts were added and diluted at 4000 - 1.9 µg/mL.

Additionally, 100µL of the dermatophyte suspension was distributed in each well. The microplates were incubated for 120 hours at 35°C. After this period, the plates were read visually. The experiments were performed in triplicate. As a control, the drugs and isolated extracts were tested to compare the combinatorial effect.

For the interaction between extracts and drugs, the Fractional Inhibitory Concentration Index formula was used: $FICI = [(MIC \text{ drug } no \text{ mix} / CIM \text{ drug isolated}) + (MIC \text{ extract in the mix} / MIC \text{ extract isolated})]$. From the FICI calculation, the interaction was evaluated following the classification described by Kumar et al. where: $FICI \leq 0.5$ for synergistic action; $0.5 < FICI \leq 1$ for additive action; $1 < FICI \leq 2$ for indifferent; $FICI > 2$ for antagonistic activity (Kumar et al. 2012).

Sorbitol and Ergosterol assay: Assays were carried out with sorbitol to evaluate the possible action of the extracts on the fungal cell wall. The MIC of the extracts against TRCBS was determined by the microdilution technique, as previously described, in a medium once supplemented with sorbitol (MW = 182.17) at 0.8 mol. l⁻¹. The interaction with the ergosterol of the fungal cells was evaluated in the presence of exogenous ergosterol, 400 µg/mL, supplemented in RPMI medium. The MIC values of the extracts were then compared in the absence and presence of sorbitol and exogenous ergosterol. As a control, the same procedure was performed with the drugs caspofungin (action on the fungal wall) and amphotericin B (mechanism of action involves interaction with ergosterol in the fungal cell membrane). The tests were performed in triplicate, and the geometric mean expressed the results (Pereira et al. 2020).

Results: The FICI for antifungals indicated a synergistic combinatorial effect between the extracts, whose results are in table 1.

When tested individually, MIC values for TRCBS of fluconazole, itraconazole, and terbinafine were 2, 0.25, and 0.05 µg/mL, respectively, while the MIC of the individual extracts ranged between 500 – 8000 µg/mL. When combined, these MIC values were reduced: fluconazole 0.25 – 1 µg/mL; itraconazole 0.03 – 0.05 µg/mL and terbinafine 0.002 – 0.01. All the extracts confirmed this tendency. In general, the MICs of the combinatorial effect ranged from 1.9 – 125 µg/mL (Table 1).

For the clinical strain TR7259, resistant to the tested drugs, only for terbinafine, no synergistic effect was observed. The individual MICs for fluconazole, itraconazole and terbinafine were 32, 0.5, 64 µg/mL. For the extracts obtained from this individual strain, higher MIC values (2000 – 8000 µg/mL) were observed compared to TRCBS. The association between azoles and extracts reduced MICs (fluconazole 1 – 8 µg/mL, itraconazole 0.06 µg/mL; extracts 62.5 – 1000 µg/mL). With terbinafine, MIC values remained the same, indicating an indifferent combinatorial effect (Table 2).

The FICI calculation (Table 2) obtained the lowest value for the TRCBS strain with terbinafine (0.06 – 0.1). In association with the extracts, itraconazole showed similar FICI values for the two strains tested (0.12 – 0.16). For the combination of extracts with fluconazole, FICI values against TRCBS were slightly higher (0.2 – 0.5) compared to the TR7259 strain (0.17 – 0.24). The association of terbinafine and extracts against TR7259 revealed FICI values equal to 2, indicating an indifferent combinatorial effect.

The MIC values of the extracts in the presence of RPMI supplemented with sorbitol did not change (Table 3), thus, without action on the cell wall of TRCBS. Caspofungin MIC values rose from 0.2 µg/mL to 1.3 µg/mL, proving the feasibility of supplementation. In the presence of RPMI supplemented with ergosterol, MIC values of the extracts increased by up to 2x when compared to the RPMI without supplementation, indicating an action on the fungal cell membrane. Amphotericin MIC values in this assay rose from 0.2 µg/mL in the medium without ergosterol to 1.8 µg/mL in the supplemented medium (Table 3).

Discussion: The concomitant isolation of *Candida* and *Trichophyton* spp. in onychomycosis has been increasingly frequent in recent years. In this environment of polymicrobial interactions, the production of essential metabolites for the survival of microorganisms occurs according to individual biological characteristics. Which culminates in a new chemical environment² Previous studies confirm this statement since they proved the interference between dermatophytes and yeasts of the genus *Candida* when co-cultivated in a solid medium. Additionally, anti-*Trichophyton* activity was detected from liquid culture extracts of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* (Lemes et al. 2021 a, b).

The change in the epidemiological profile of onychomycosis associated with inadequate response to antifungal treatment leads to the chronic pattern of these infections. It is explained by factors related to the pathogen, such as adaptability to the host, the production of virulence factors, new resistance mechanisms, and even biofilm formation. In parallel, factors related to the host are attributed to humoral or cellular immunity, anatomical sites of infection with low penetration of drugs, and therapeutic abandonment (Gupta et al. 2018 a, b). Recalcitrant dermatophytosis include mechanisms of resistance to antimicrobials and other possible causes of therapeutic failures. In this context, Gaurav et al. found highly resistant isolates to terbinafine and fluconazole attributed to the irrational use of antifungal medications, an environment with high

humidity and rich in fat favoring the persistence and survival of dermatophytes in the skin and its annexes (Gaurav et al. 2020). In the present study, a clinical strain resistant to fluconazole and terbinafine, and dose-dependent to itraconazole, was used, in addition to a reference strain (TRCBS) with a drug-sensitive profile.

The checkerboard is a method that presents practical execution, standardization, and low costs, being the most used in the association of antifungal drugs (Cokol-Cakmak and Cokol 2019). The use of these combinations increases the efficacy and spectrum of these drugs, decreases their toxicity, and prevents the selection of resistant microorganisms (Bellio et al. 2021). Additionally, some *in vitro* studies have demonstrated the benefit of interaction between different antifungal drugs against dermatophytes, either with drugs already used for treating onychomycosis or natural products such as plant extracts. In an evaluation of the combinatorial effect between clioquinol/terbinafine, and clioquinol/ciclopirox, Costa et al. showed synergistic action against 42% and 50% of the dermatophyte isolates tested, respectively. In the triple association between the three drugs, this index rose to 75%, with FICI values between 0.5 – 0.6, indicating synergistic action (Costa et al. 2020).

The association of drugs with extracts from pure and mixed cultures, in general, showed a synergistic activity, with emphasis on extracts from mixed cultures, in association with terbinafine against TRCBS, with low FICI indices concerning the established cutoff point (≤ 0.5).

Terbinafine is an allylamine drug that acts on ergosterol biosynthesis by inhibiting the enzyme squalene epoxidase. Resistance to this drug has been attributed to point mutations in the SQLE target gene, resulting in the substitution of a single amino acid at one of four positions (Leu393, Phe397, Phe415, His440) of the SQLE protein (Khurana et al. 2019; Buil et al. 2021). In an extensive review of the emergence of terbinafine-resistant dermatophytes, Shen et al. reported high MIC values for *T. rubrum*, *T. interdigitale*, and *T. mentagrophytes*, with a significant number of alterations in individual target proteins in isolates from treatment-resistant cases (Shen et al. 2022). In the current study, molecular assays on mutations in target proteins in the TR7259 strain were not performed. However, an indifferent effect between terbinafine and extracts was observed. Probable common targets of action may have influenced the observed response. Despite not having a synergistic combinatorial with terbinafine for the resistant strain, the FICIs for fluconazole and itraconazole point out as alternatives for treatment in this case, with satisfactorily synergistic values (0.12 – 0.2).

The sorbitol assay allows the search for compounds that inhibit the synthesis of fungal cell wall components such as glycans, mannans, chitin, or regulatory mechanisms. It is based on the principle that compounds with such action have higher MIC values in the presence of sorbitol when compared to MICs in the medium without supplementation. This fact is justified by sorbitol osmotic protection in fungal protoplasts, allowing their growth even under the action of the compound (Pippi et al. 2020; Leite et al. 2022). As shown in table 3, the MIC values of the extracts in the presence of sorbitol did not change, suggesting the non-action of these extracts on the fungal cell wall. In contrast to sorbitol, the assay performed with ergosterol showed MIC values of the extracts against TRCBS, increased by up to 2x in the supplemented medium. Therefore, an action of extracts on the plasma membrane interfering with the maintenance and integrity of the fungal cell. Although the composition of the extracts is unknown, it is hypothesized that there is an action on the membrane, which facilitates the penetration of the antifungals, increasing the intracellular quantity and consequent high toxicity for the fungal strains. Studies of the antifungal activity of pure culture extracts of *Candida parapsilosis* or cultures mixed with dermatophytes are unpublished. Additional investigations on extract composition and specific mechanisms of action on fungal cells will be necessary. However, the synergistic activity evidenced in this study brings new therapeutic alternatives for treating onychomycosis.

Statements & Declarations:

Funding: No funding was obtained for this study.

Competing interests: I declare that the authors have no competing interests that might be perceived to influence the results and/or discussion reported in this paper.

Availability of Data and Materials: Please, contact the corresponding author (lemes_th@outlook.com).

Author's Contribution:

Thiago Henrique Lemes: study design/development and methodology/Collection of Data and Data Analysis/ Interpretation, Writing All/Sections of the Manuscript.

Margarete Teresa Gottardo de Almeida: study design/development and methodology/Collection of Data and Data Analysis/ Interpretation, manuscript revision;

Julyanna Andrade Silva Nascentes: Methodology and obtention of extracts;

Luis Octávio Regasini: Methodology and obtention of extracts;

João Paulo Zen Siqueira: manuscript revision;

Taiza Maschio-Lima: manuscript revision;

Veridianna Camilo Pattini: Development of susceptibility testing;

Mariela Domiciano Ribeiro: Development of susceptibility testing;

Bianca Gottardo de Almeida: Development of checkerboard assay

Acknowledgments: Authors would like the financial support of the National Council for the Improvement of Higher Education (CAPES) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for the scholarships granted. We acknowledge the Multi-user Laboratory (LMU) at São Jose do Rio Preto (Famerp).

References:

Leung AKC, Lam JM, Leong KF, Hon KL, Barankin B, Leung AAM, Wong AHC (2020) Onychomycosis: An Updated Review. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov 14(1): 32-45. <https://doi.org/10.2174/1872213X13666191026090713>.

Veiga FF, de Castro-Hoshino LV, Rezende PST, Baesso ML, Svidzinski TIE (2022) Insights on the etiopathogenesis of onychomycosis by dermatophyte, yeast and non-dermatophyte mould in ex vivo model. Exp Dermatol 31(11):1810-1814. <https://doi.org/10.1111/exd.14643>.

Khurana A, Sardana K, Chowdhary A (2019) Antifungal resistance in dermatophytes: Recent trends and therapeutic implications. *Fungal Genet Biol* 132:103255. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.103255>.

Gupta AK, Carviel J, Shear NH (2018a) Onychomycosis and chronic fungal disease: Exploiting a commensal disguise to stage a covert invasion. *J Cutan Med Surg* 22(3):318-322. <https://doi.org/10.1177/1203475417745827>.

Gupta AK, Carviel J, Shear NH (2018b) Antibiofilm treatment for onychomycosis and chronic fungal infections. *Skin Appendage Disord* 4(3): 136-140. <https://doi.org/10.1159/000480023>.

Brescini L, Fioriti S, Morroni G, Barchiesi F (2021) Antifungal combinations in dermatophytes. *J Fungi (Basel)* 7(9):727. <https://doi.org/10.3390/jof7090727>

CLSI (2017a) *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi*. 3rd ed. CLSI standard M38-3rd. Wayne, PA. Clin Lab Stand Inst.

CLSI (2017b) *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*. 4th ed. CLSI standard M27. Wayne, PA. Clin Lab Stand Inst.

Kumar SN, Siji JV, Nambisan B, Mohandas C (2012) Activity and synergistic interactions of stilbenes and antibiotic combinations against bacteria in vitro. *World J Microbiol Biotechnol* 28 (11):3143-3150. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1124-0>.

Pereira FO, Guerra FQS, Filho AAO, Lima EO (2020) Estudo do potencial antifúngico e do mecanismo de ação do timol contra cepas de *Candida parapsilosis* resistentes ao fluconazol e a anfotericina B. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas* 19(3),489–494. <https://doi.org/10.9771/cmbio.v19i3.32901>.

Lemes TH, Torrezan GS, Polaquini, CR, Regasini LO, Almeida BG, Brizzotti-Mazuchi NS, Ribeiro MD, Maschio-Lima T, Caetano MH, Pattini VC, Paziani MH,

Zeska Kress MR, Siqueira JPZ, Almeida MTG (2021a) *In vitro* antifungal activity of *Candida* culture extracts against *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. Brazilian Journal of Case Reports 1(4):135–152. <https://doi.org/10.52600/2763-583X.bjcr.2021.1.4.135-152>.

Lemes TH, Maschio-Lima T, Brizzotti NS, Siqueira JPZ, Almeida MTG (2021b) O estudo da interferência biológica entre dermatófitos e leveduras em onicomicoses. International Journal of Health Science – PDVS 1:75-86.

Gaurav V, Bhattacharya SN, Sharma N, Datt S, Kumar P, Rai G, Singh PK, Taneja B, Das S (2021) Terbinafine resistance in dermatophytes: Time to revisit alternate antifungal therapy. J Med. Mycol 31:101087. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2020.101087>

Cokol-Cakmak M, Cokol M (2019) Miniaturized checkerboard assays to measure antibiotic interactions. Methods Mol Biol 1939:3-9. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9089-4_1.

Bellio P, Fagnani L, Nazzicone L, Celenza G (2021) New and simplified method for drug combination studies by checkerboard assay. MethodsX 11(8):101543. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101543>.

Costa B, Pippi B, Kaminski TFA, Andrade SF, Fuentfria AM (2020) *In vitro* antidermatophytic synergism of double and triple combination of clioquinol with ciclopiros and terbinafine. Mycoses 63:993-1001. <https://doi.org/10.1111/myc.13127>.

Buil JB, Bronckers IMGJ, Driessen RJB, Do Nguyen Dan T, Melchers WJG, Verweij PE (2021) Terbinafine resistentie als verklaring voor therapiefalen bij tinea corporis [Terbinafine resistance explains treatment failure in a patient with tinea corporis]. Ned Tijdschr Geneesk 30:165:D5009.

Shen JJ, Arendrup MC, Verma S, Saunte DML (2022) The emerging terbinafine-resistant *Trichophyton* epidemic: What Is the Role of Antifungal Susceptibility Testing? *Dermatology* 238(1):60-79. <https://doi.org/10.1159/000515290>

Pippi B, Lopes W, Reginatto P, Silva FEK, Joaquim AR, Alves RJ, Silveira GP, Vainstein MH, Andrade SF, Fuentefria AM (2019) New insights into the mechanism of antifungal action of 8-hydroxyquinolines. *Saudi Pharm J* 27(1):41-48. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.07.017>

Leite MC, de Brito Bezerra AP, de Sousa JP, de Oliveira Lima E (2015) Investigating the antifungal activity and mechanism(s) of geraniol against *Candida albicans* strains. *Med Mycol* 53(3):275-84. <https://doi.org/10.1093/mmy/myu0>

Table 1. Checkerboard assay, the combinatorial effect between extracts and standard antifungal drugs (fluconazole, itraconazole, and terbinafine) against *T. rubrum* (CBS and clinical isolate).

TRCBS						TR7259							
Extracts	MIC FLC (µg/mL)	MIC EXT (µg/mL)	MIC Combinatorial (µg/mL)		FICI	CE	Extracts	MIC FLC (µg/mL)	MIC EXT (µg/mL)	MIC Combinatorial (µg/mL)		FICI	CE
			FLC	EXT						FLC	EXT		
CP	2	500 - 2000	1 – 0.25	1.9 - 125	0.2	S	CP	32	2000 - 4000	4	250	0.21	S
CPTR	2	2000 - 8000	1	3.9	0.5		CPTR	32	8000	4 - 8	500	0.24	
CPTM	2	2000 - 8000	0.5 - 1	3.9 - 125	0.4		CPTM	32	8000	1 - 4	250 - 1000	0.12	
TR	2	4000 - 8000	0.25 - 1	3.9 – 31.2	0.3		TR	32	4000 - 8000	4	125 - 250	0.18	
TM	2	2000 - 8000	1	3.9	0.5		TM	32	8000	4	125 - 250	0.17	
Extracts	MIC ITRA (µg/mL)	MIC EXT (µg/mL)	MIC Combinatorial (µg/mL)		FICI	CE	Extracts	MIC ITRA (µg/mL)	MIC EXT (µg/mL)	MIC Combinatorial (µg/mL)		FICI	CE
			ITRA	EXT						ITRA	EXT		
CP	0.25	500 - 2000	0.03 – 0.05	1.9 – 62.5	0.13	S	CP	0.5	2000 - 4000	0.06	62,5 - 250	0.13	S
CPTR	0.25	2000 - 8000	0.03 – 0.05	3.9 - 125	0.13		CPTR	0.5	8000	0.06	250	0.16	
CPTM	0.25	2000 - 8000	0.03 – 0.05	3.9 – 31.2	0.12		CPTM	0.5	8000	0.06	125 - 1000	0.14	
TR	0.25	4000 - 8000	0.03 – 0.05	3.9 – 31.2	0.13		TR	0.5	4000 - 8000	0.06	125 - 31.2	0.12	
TM	0.25	2000 - 8000	0.03 – 0.05	3.9 – 31.2	0.12		TM	0.5	8000	0.06	125	0.12	
Extracts	MIC TERB (µg/mL)	MIC EXT (µg/mL)	MIC Combinatorial (µg/mL)		FICI	CE	Extracts	MIC TERB (µg/mL)	MIC EXT (µg/mL)	MIC Combinatorial (µg/mL)		FICI	CE
			TERB	EXT						TERB	EXT		
CP	0,02	500 - 2000	0.003 – 0.002	1.9	0.1	S	CP	64	2000 - 4000	64	4000	2	I
CPTR	0,03	2000 - 8000	0.01 – 0.002	3.9	0.13		CPTR	64	8000	16 - 64	4000 - 8000	2	
CPTM	0,03	2000 - 8000	0.01 – 0.002	3.9	0.06		CPTM	64	8000	64	4000 - 8000	2	
TR	0,05	4000 - 8000	0.02 – 0.01	3.9	0.09		TR	64	4000 - 8000	32 - 64	2000 - 8000	2	
TM	0,03	2000 - 8000	0.02 – 0.001	3.9	0.06		TM	64	8000	64	8000	2	

MIC: Minimum inhibitory concentration; EXT: extract; FLC: fluconazole; ITRA; itraconazole; TERB: terbinafine; FICI: fractional inhibitory concentration index; CE: combinatorial effect; S: synergistic; I: indifferent.

Table 2. Geometric means of FICIs, combinatorial effect synergistic.

FICI – Geometric means						
	TRCBS			TR7259		
	FLC	ITRA	TERB	FLC	ITRA	TERB
CP	0.2	0.13	0.1	0.21	0.13	2
CPTR	0.5	0.13	0.13	0.24	0.16	2
CPTM	0.4	0.12	0.06	0.12	0.14	2
TR	0.3	0.13	0.09	0.18	0.12	2
TM	0.5	0.12	0.06	0.17	0.12	2

FICI: fractional inhibitory concentration index; FLC: fluconazole; ITRA; itraconazole; TERB: terbinafine.

Table 3. Geometric means of MICs values of extracts and drugs in the sorbitol–ergosterol assay

Ergosterol - TRCBS - MIC (µg/mL)				
Extracts	Media no supplemented		Media supplemented	
	Amphotericin	Extract	Amphotericin	Extract
CP	0.2	1260	1.3	3174,8
CPTR	0.2	4000	0.6	5039,7
CPTM	0.3	6350	0.8	8000,0
TR	0.2	2520	1.0	6349,6
TM	0.3	4000	1.0	6349,6
Sorbitol - TRCBS – MIC/ECM (µg/mL)				
Extracts	Media no supplemented		Media supplemented	
	Caspofungin	Extract	Caspofungin	Extract
CP	0.2	1260	1.3	1260
CPTR	0.2	4000	1.3	4000
CPTM	0.2	6350	1.3	6350
TR	0.2	2520	1.3	2520
TM	0.2	3175	1.3	3175

8. ARTIGO II

Candida parapsilosis* culture extracts: *in vitro*, antagonistic action against *Candida albicans*, *Candida auris* e *Candida parapsilosis

Thiago Henrique Lemes¹, Julyanna Andrade Silva Nascentes¹, Luis Octávio Regasini¹, Taiza Maschio-Lima¹, Bianca Gottardo de Almeida¹, Mariela Domiciano Ribeiro², Veridianna Camilo Pattini¹, Leticia de Queiroz Mozaner¹, João Paulo Zen Siqueira², Margarete Teresa Gottardo de Almeida².

Affiliations:

¹São Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences, São José do Rio Preto, Brazil.

²São José do Rio Preto School of Medicine (FAMERP), Dept. of Dermatological, Infectious, and Parasitic Diseases São José do Rio Preto, Brazil.

Corresponding author:

Thiago Henrique Lemes

e-mail: th.lemes@unesp.br

Acknowledgments: Authors would like to the financial support of the National Council for the Improvement of Higher Education (CAPES) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), for the scholarships granted. We acknowledge the Multi-user Laboratory (LMU) at São Jose do Rio Preto (Famerp).

Statements & Declarations: Funding not applicable.

Artigo publicado em 29.11.2022 na revista *Brazilian Journal of Case Reports (BJCR)* (ISSN 2763-583X): <https://doi.org/10.52600/2763-583X.bjcr.2023.3.1.24-29>.

Abstract:

Fungal infections caused by yeasts of *Candida* genus has increased significantly in recent years. Additionally, resistance to therapy, associated with the scarce arsenal of antifungal drugs, is an aggravating factor causing high morbidity and mortality, especially in immunocompromised patients or those undergoing treatment with another antimicrobials.

During the process of invasion and infection, *Candida* species produces metabolites in competitive environments that can self-regulate population density, in addition to controlling several virulence factors and exerting action on other microorganisms. In view of this fact, the present study evaluated the antifungal activity, in vitro, of the pure culture extract of *Candida parapsilosis* against *Candida albicans*, *Candida auris* and *Candida parapsilosis*. Fungal culture extracts of *C. parapsilosis*, were prepared in 500 mL of Sabouraud Dextrose Broth. After, liquid-liquid extraction was carried out with ethyl acetate and drying in a rotary evaporator. Subsequently, tests were performed to determine the minimum inhibitory concentration and minimum fungicidal concentration. The antifungal activity of the extracts against *Candida* species showed values of minimum inhibitory concentration ranging 500 – 2000 µg/mL. The geometric mean of higher values was observed for *C. albicans* (2000 µg/mL), followed by *C. parapsilosis* (1260 µg/mL) and *C. auris* (1000 µg/mL). Minimum fungicide concentration values were higher for *C. albicans* and *C. parapsilosis* (2000 µg/mL), when compared to *C. auris* strains (1414 µg/mL). Future investigations for the identification and composition of this fungal culture extract will provide insights about metabolites are present and involved in the antifungal activity shown here, contributing for the future to new therapeutic approaches in the control of infections caused by *Candida* yeasts.

Key words: fungal infections; *Candida* spp.; antifungal activity.

Introduction

Candida species are the most common causal agents of infections in hospitalized patients with high rates of morbidity and mortality. The main etiologic agent of these infections is the *Candida albicans* yeast, however, in recent years, there has been an increasing incidence of infections caused by non-*albicans* species such as *Candida parapsilosis* [1]. The yeast *Candida auris* has gained prominence, as a pathogen of great concern for public health services, responsible for invasive infections with a high mortality rate. In addition, its rapid dispersion in healthcare environments, and its profile of resistance to multiple classes of conventional antifungals [2,3], impact all health area. The multidrug resistance associated with virulence and prolonged survival on surfaces makes this microorganism gain considerable attention from the scientific community [4]. The treatment for infections fungal agents consists of the use of topical or systemic antifungal agents or a combination of both, whose mechanism of action involves the main structure as cell wall or membrane constituents [5]. In recent years, the incidence of recurrent infections, with the emergence of strains resistant to the drugs available for treatment, has increased and become a challenge for the control of these infections [6,7]. Therefore, the search for new compounds with antifungal action has gained considerable scientific interest over the years, essential for new therapeutic practices in the control of these infections. The present study evaluated the antifungal effect of the fungal culture extract of *Candida parapsilosis* against *Candida albicans*, *Candida auris* and *Candida parapsilosis*.

Methods

Microorganisms: Clinical isolates of *C. parapsilosis* (CP2 – CP6), *C. albicans* (CA2 – CA6), *C. auris* (CAU2), from collection culture of Laboratory of Microbiology of São José do Rio Preto Medical School (FAMERP) were used. The isolates were

registered in the Brazilian National System of Genetic Resource Management and Associated Traditional Knowledge (SisGen), under the protocol number AF41CDD. As control, reference strains from the American Type Culture Collections of *C. parapsilosis* 22019 (CPATCC), *C. albicans* 90028 (CAATCC) and from the Centraalbureau voor Schimmelcultures of *C. auris* 10913 (CAUCBS) were used.

Preparation of Extracts: To obtain the *C. parapsilosis* (CP) culture extract, colonies were subcultured on Sabouraud agar (DIFCO®) incubated at 35°C for 24 hours. After growing, new inoculation was performed into 500 mL of Sabouraud Dextrose broth (DIFCO®), following Mac Farland scale turbidity adjustment 10, and incubation at 35°C for 72 hours.

Subsequently, filtration was performed on a millipore 0.2 µm membrane and liquid-liquid extraction, using ethyl acetate as counter-phase. The procedure was repeated three times to allow the total extraction of fungal metabolites from the culture media. The ethyl acetate phase was submitted to a rotary evaporator for drying. The resulting bulk compound was solubilized in sterile distilled water solution with 10% dimethyl sulfoxide (Synth®).

Susceptibility profile *Candida* spp.: The susceptibility profile of *Candida* spp. against drugs and extract was determined by microdilution technique. For *Candida* species, fluconazole was used according to the protocol described by document M27-Ed4 2017 of the Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) in sterile 0.85% saline [8]. Subsequently, dilutions were performed at 1:100 – 1:20 in RPMI – 1640 medium (Sigma-Aldrich® - Rosen Park Media Institute), obtaining a concentration of 5×10^2 – 2.5×10^3 CFU/mL. The fungal inoculum, 0.1 mL, was plated into 96-well polystyrene plates containing RPMI-1640 medium under different concentrations of fluconazole (128 – 0.25 µg/mL) and extract (2000 – 15.6 µg/mL). Sterile control (containing 0.2 mL of RPMI) and growth control

(containing only inoculum and RPMI) were prepared. The plates were incubated at 35°C for 24 hours. The minimum inhibitory concentration (MIC) of fluconazole was determined as the lowest concentration capable to inhibiting 70% of fungal growth (MIC₇₀), and for the extract, the concentration capable to inhibiting 100% (MIC₁₀₀). To determine the minimum fungicide concentration (MFC), an aliquot from each well was plated in Sabouraud Agar medium. The CFM was defined as the lowest concentration of the extract to inhibit visible growth in solid medium. All tests were performed in triplicate.

Results: MIC values for fluconazole of *Candida* species are described in table 1. *C. albicans* and *C. parapsilosis* strains showed values of inhibition between 0.25 and 2 µg/mL. For *C. auris* strains, the higher MIC value was observed for the clinical strain (> 128 µg/mL) when compared to the reference strain (8 µg/mL).

Table 1. Values of minimum inhibitory concentration (MIC) of fluconazole against *Candida* spp.

<i>C. albicans</i>	MIC (µg/mL)	<i>C. parapsilosis</i>	MIC (µg/mL)	<i>C. auris</i>	MIC (µg/mL)
CAATCC	1	CPATCC	0.5	CAUC BS	8
CA2	1	CP2	1	CAU2	> 128
CA3	1	CP3	1		
CA4	0.25	CP4	2		
CA5	0.25	CP5	1		
CA6	0.5	CP6	2		

CA: *C. albicans*; CP: *C. parapsilosis*; CAU: *C. auris*.

The antifungal activity of the extracts against *Candida* species showed MIC values between 500 – 2000 µg/mL (Table 2). *C. parapsilosis* strains showed greater sensitivity to the extract when compared to *C. albicans* strains. Regarding to CFM, for *C. albicans* and *C. parapsilosis* strains MIC value was 2000 µg/mL. The highest

CFM value was observed for clinical *C. auris* (4000 µg/mL) and the lowest for reference *C. auris* (500 µg/mL) (Figure 1).

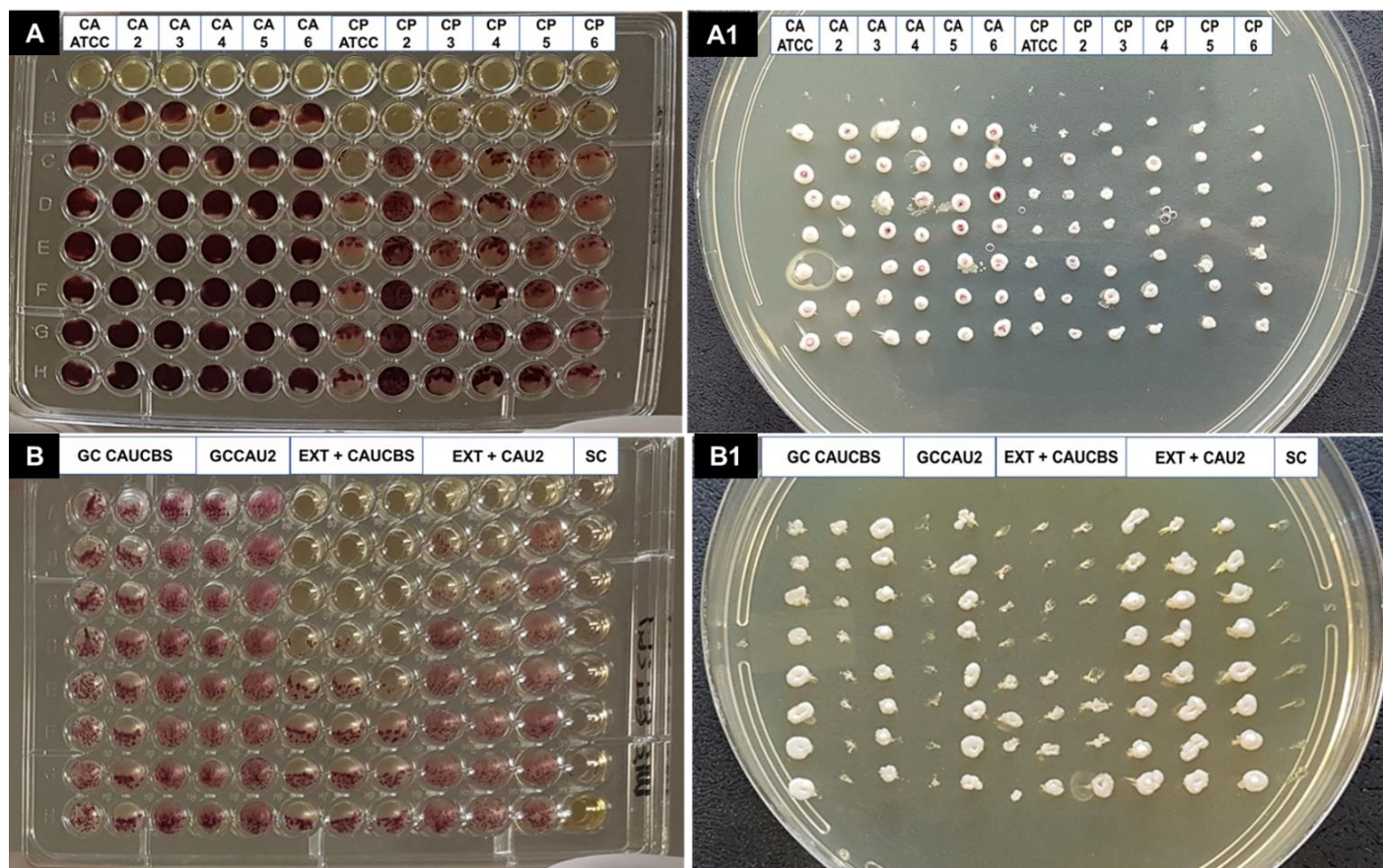
Table 2. Values of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of *C. parapsilosis* extracts against *Candida* spp.

	MIC (µg/mL)	MFC (µg/mL)		MIC (µg/mL)	MFC (µg/mL)		MIC (µg/mL)	MFC (µg/mL)
CAATCC	2000	2000	CPATCC	1000	2000	CAUCBS	500	500
CA2	2000	2000	CP2	1000	2000	CAU2	2000	4000
CA3	2000	2000	CP3	1000	2000			
CA4	2000	2000	CP4	1000	2000			
CA5	2000	2000	CP5	2000	2000			
CA6	2000	2000	CP6	2000	2000			

CA: *C. albicans*; CP: *C. parapsilosis*; CAU: *C. auris*.

Considering geometric mean of MIC values, the higher inhibition values were observed for *C. albicans* (2000 µg/mL), followed by *C. parapsilosis* (1260 µg/mL) and *C. auris* (1000 µg/mL). Regarding CFM, both *C. albicans* and *C. parapsilosis* had a higher geometric mean (2000 µg/mL), when compared to *C. auris* strains (1414 µg/mL) (Table 3).

Figure 1. Photographic image of culture plates after microdilution of *C. parapsilosis* extracts against *Candida* species: (A) MIC *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*; (B) MIC *Candida auris* and (A1) MFC *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*; (B1) MFC *Candida auris*.



CA: *Candida albicans*; CP: *C. parapsilosis*; CAU: *C. auris*; GC; growth control; EXT: extract; SC: sterility control.

Table 3. Geometric means values of minimum concentration inhibitory (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of *Candida parapsilosis* culture extracts against *Candida* spp

	Geometric means	
	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MFC ($\mu\text{g/mL}$)
CA	2000	2000
CP	1260	2000
CAU	1000	1414

CA: *C. albicans*; CP: *C. parapsilosis*; CAU: *C. auris*.

Discussion and conclusion: The incidence of fungal infections increases worldwide, especially in immunocompromised people or those undergoing treatment with antimicrobials. Yeasts of the *Candida* genus are the most common microorganisms involved in this process, with high rates of resistance to antifungal therapy [9]. The *C. albicans* species is a commensal pathogen of the oropharyngeal cavity, skin, and human gastrointestinal tract, but in homeostasis disorders they evolve to clinical manifestations, which comprise superficial to systemic infections [10]. In this context, a wide variety of virulence factors such as polymorphism, protease lipases and biofilm formation are produced for colonization and invasion of the host tissue [11]. Despite *C. albicans* being the main etiologic agent in this category, the growing increases in species such as *C. parapsilosis* with strains resistant to antifungal drugs has changed this epidemiological profile [12]. The particular importance of the increased incidence of *C. parapsilosis* is due to its ability to form biofilms on intravascular devices and prosthetic materials, gastrointestinal colonization and transmission by colonized hands of health professionals, making it difficult to control [13]. Epidemiological data reported by Dizbay et al., showed a high incidence of candidemia by *C. parapsilosis* in non-neutropenic critical patients from a tertiary hospital in Turkey. At this reported data, *C. parapsilosis* corresponded to 77% of the cases against 23% of *C. albicans* with a high mortality rate (65%) [14]. Corroborating with these data, Mesini et al. presented a study about epidemiology changes of candidemia, reporting the increases cases of fluconazole-resistant by *C. parapsilosis* strains with mortality rates of 33% [15]. In contrast to the Mesini study, here the *C. albicans*, *C. parapsilosis* strains showed fluconazole-sensitive susceptibility profiles. The MIC of extracts slightly lower for *C. parapsilosis* (1260 µg/mL) when compared to *C. albicans* (2000 µg/mL). In addition to the rise of *C. parapsilosis*, the emergence of *C. auris* and its resistance profile to available antifungal agents is a concern for global public health. Since 2009 infections caused by *C. auris* have

been reported in more than 40 countries with strains isolated predominantly resistant to one or more classes of antifungal drugs [16]. Studies by Maphanga and colleagues revealed that up to 90% of strains isolated in South Africa were resistant to fluconazole [17]. In the present study the reference strain of *C. auris* presented a profile sensitive to fluconazole and, additionally to the extract (500 µg/mL) compared to the same clinical strain (2000 µg/mL). The differences in MICs values can be explained by individual biological characteristics of these strains, with previous exposure to environments that demand physiological changes as a defense mechanism for tolerance and survival of these microorganisms.

During the process of invasion and infection, *Candida* species generate metabolites in competitive environments. Such metabolites can self-regulate population density, and controlling several virulence factors [18]. Oliver et al. showed in study the metabolic profiles of *Candida* spp. with 66 metabolites identified and quantified, associated with glycolysis or gluconeogenesis, tricarboxylic acid cycle, nucleic acid synthesis, amino acid and lipid metabolism [19].

The antifungal action of *C. parapsilosis* extract against strains of *C. parapsilosis* itself species when administered exogenously, are observed in other situations, such as farnesol, a molecule produced by *C. albicans* that regulates population density and several virulence factor [20]. However, in exogenous administration against strains of *C. albicans* present a high antimicrobial and antibiofilm potential [21, 22].

Although the composition of the *C. parapsilosis* extract obtained is unknown, its antifungal potential against *Candida* spp is evident. Future investigations to identify the composition of this extract will allow further clarification of which metabolites involved in the antifungal activity shown here,

contributing to new therapeutic approaches in infections control of yeasts, mostly the genus *Candida*.

References

1. Deorukhkar SC, Saini S, Mathew S. Non-albicans *Candida* Infection: An Emerging Threat. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2014, 615958. doi: 10.1155/2014/615958.
2. Forsberg K, Woodworth K, Walters M, Berkow EL, Jackson B, Chiller T, Vallabhaneni S. *Candida auris*: The recent emergence of a multidrug-resistant fungal Pathogen. *Med Mycol*. 2019 Jan 1;57(1):1-12. doi: 10.1093/mmy/myy156.
3. Lone SA, Ahmad A. *Candida auris*-the growing menace to global health. *Mycoses*. 2019 Aug;62(8):620-637. doi: 10.1111/myc.12904.
4. Du H, Bing J, Hu T, Ennis CL, Nobile CJ, Huang G. *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. *PLoS Pathog*. 2020 Oct 22;16(10):e1008921. doi: 10.1371/journal.ppat.1008921.
5. Bassetti M, Righi E, Montravers P, Cornely OA. What has changed in the treatment of invasive candidiasis? A look at the past 10 years and ahead. *J Antimicrob Chemother*. 2018 Jan 1;73(suppl_1): i14-i25. doi: 10.1093/jac/dkx445.
6. de Oliveira Santos GC, Vasconcelos CC, Lopes AJO, de Sousa Cartágenes MDS, Filho AKDB, do Nascimento FRF, Ramos RM, Pires ERB, de Andrade MS, Rocha FMG, de Andrade Monteiro C. *Candida* Infections and Therapeutic Strategies: Mechanisms of Action for Traditional and Alternative Agents. *Front Microbiol*. 2018 Jul 3;9:1351. doi: 10.3389/fmicb.2018.01351.
7. von Lilienfeld-Toal M, Wagener J, Einsele H, Cornely OA, Kurzai O. Invasive Fungal Infection. *Dtsch Arztebl Int*. 2019 Apr 19;116(16):271-278. doi: 10.3238/arztebl.2019.0271. PMID: 31159914; PMCID: PMC6549129.

8. [CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute 2012. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; fourth informational supplement. Wayne: Approved Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012. (Document M27-S4).
9. Černáková L, Light C, Salehi B, Rogel-Castillo C, Victoriano M, Martorell M, Sharifi-Rad J, Martins N, Rodrigues CF. Novel Therapies for Biofilm-Based *Candida* spp. Infections. Adv Exp Med Biol. 2019;1214:93-123. doi: 10.1007/5584_2019_400.
10. Talapko J, Juzbašić M, Matijević T, Pustijanac E, Bekić S, Kotris I, Škrlec I. *Candida albicans*-The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. J Fungi (Basel). 2021 Jan 22;7(2):79. doi: 10.3390/jof7020079.
11. Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. Microbes Infect. 2016 May;18(5):310-21. doi: 10.1016/j.micinf.2016.01.002.
12. Qin J, Yang H, Shan Z, Jiang L, Zhang Q. Clinical efficacy and safety of antifungal drugs for the treatment of *Candida parapsilosis* infections: a systematic review and network meta-analysis. J Med Microbiol. 2021 Oct;70(10):001434. doi: 10.1099/jmm.0.001434.
13. Tóth R, Nosek J, Mora-Montes HM, Gabaldon T, Bliss JM, Nosanchuk JD, Turner SA, Butler G, Vágvölgyi C, Gácsér A. *Candida parapsilosis*: from Genes to the Bedside. Clin Microbiol Rev. 2019 Feb 27;32(2):e00111-18. doi: 10.1128/CMR.00111-18.
14. Dizbay M, Fidan I, Kalkanci A, Sari N, Yalcin B, Kustimur S, Arman D. High incidence of *Candida parapsilosis* candidaemia in non-neutropenic critically ill patients: epidemiology and antifungal susceptibility. Scand J Infect Dis. 2010;42(2):114-20. doi: 10.3109/00365540903321572.
15. Mesini A, Mikulska M, Giacobbe DR, Del Puente F, Gandolfo N, Codda G, Orsi A, Tassinari F, Beltramini S, Marchese A, Icardi G, Del Bono V, Viscoli C. Changing epidemiology of candidaemia: Increase in fluconazole-resistant *Candida parapsilosis*. Mycoses. 2020 Apr;63(4):361-368. doi: 10.1111/myc.13050.

16. Du H, Bing J, Hu T, Ennis CL, Nobile CJ, Huang G. *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. PLoS Pathog. 2020 Oct 22;16(10):e1008921. doi: 10.1371/journal.ppat.1008921.
17. Maphanga TG, Naicker SD, Kwenda S, Muñoz JF, van Schalkwyk E, Wadula J, Nana T, Ismail A, Coetzee J, Govind C, Mtshali PS, Mpembe RS, Govender NP; for GERMS-SA. In Vitro Antifungal Resistance of *Candida auris* Isolates from Bloodstream Infections, South Africa. Antimicrob Agents Chemother. 2021 Aug 17;65(9):e0051721. doi: 10.1128/AAC.00517-21.
18. Albuquerque P, Casadevall A. Quorum sensing in fungi--a review. Med Mycol. 2012; 50(4): 337-345. doi: 10.3109/13693786.2011.652201
19. Oliver JC, Laghi L, Parolin C, Foschi C, Marangoni A, Liberatore A, Dias ALT, Cricca M, Vitali B. Metabolic profiling of *Candida* clinical isolates of different species and infection sources. Sci Rep. 2020 Oct 7;10(1):16716. doi: 10.1038/s41598-020-73889-1.
20. Yapıcı M, Gürsu BY, Dağ İ. In vitro antibiofilm efficacy of farnesol against *Candida* species. Int Microbiol. 2021 May;24(2):251-262. doi: 10.1007/s10123-021-00162-4.
21. Zhu J, Krom BP, Sanglard D, Intapa C, Dawson CC, Peters BM, Shirtliff ME, Jabra-Rizk MA. Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans* is mediated by Cdr1-p extrusion and depletion of intracellular glutathione. PLoS One. 2011;6(12):e28830. doi: 10.1371/journal.pone.0028830.
22. Nagy F, Vitális E, Jakab Á, Borman AM, Forgács L, Tóth Z, Majoros L, Kovács R. In vitro and in vivo Effect of Exogenous Farnesol Exposure Against *Candida auris*. Front Microbiol. 2020 May 20;11:957. doi: 10.3389/fmicb.2020.00957.

9. ARTIGO III

Antagonistic interactions in onychomycosis

Antagonistic interactions between etiological agents of onychomycosis: antifungal activity of extracts of pure and mixed cultures of *Candida* spp. and *Trichophyton* spp.

Thiago Henrique Lemes¹, Julyanna Andrade Silva Nascentes¹, Luis Octávio Regasini¹, João Paulo Zen Siqueira², Taiza Maschio-Lima¹, Bianca Gottardo de Almeida¹, Mariela Domiciano Ribeiro², Glaucia Rigotto Caruso³, Ludmilla Tonani³, Marcia Regina von Zeska Kress³ and Margarete Teresa Gottardo de Almeida².

Affiliations:

¹São Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences, São José do Rio Preto, Brazil.

²São José do Rio Preto School of Medicine (FAMERP), Departament. Of Dermatological, Infectious, and Parasitic Diseases, São José do Rio Preto, Brazil.

³Department of Clinical Analysis, Toxicology and Food Sciences, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP).

Corresponding author:

Thiago Henrique Lemes

e-mail: th.lemes@unesp.br

Artigo submetido para a Revista Mycologia. Print ISSN: 0027-5514 Online ISSN: 1557-2536

ABSTRACT

Onychomycosis is a nail infection characterized by prolonged therapy and high recurrence rates responsible for recurrence and recalcitrance. Dermatophytes are primarily causative agents of these infections, followed by yeast and non-dermatophyte filamentous fungi. The scarce antifungal arsenal used for treatment and the change in the susceptibility profile of the agents has contributed to the complex control of onychomycosis. The present study aimed to evaluate the antifungal activity of extracts obtained from pure and mixed cultures of dermatophytes and *Candida parapsilosis* against *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes*. *In vivo* toxicity tests with *Galleria mellonella* and death kinetics with a time-kill assay were performed. Antagonism was determined through microdilution assays with minimum inhibitory concentration (MIC) values between 250 and 8000 µg/mL against dermatophytes. In the kinetics of microbial death, the activities of the extracts resulted in the inhibition of dermatophytes in 48 hours compared to the controls. The toxicity tests of the extracts with *Galleria mellonella* were negative. The culture extracts of *Candida* e dermatophytes present remarkable non-toxic bioactive metabolites capable of inhibiting pathogenic fungi, opening new therapeutic perspectives.

KEYWORDS: Onychomycosis: Antagonism: Dermatophytes: *Candida* spp.: Antifungal activity.

INTRODUCTION

Onychomycosis is a nail infection of worldwide incidence clinically characterized by detachment, discoloration, hyperkeratosis, and onycholysis of the nail bed (Leung et al., 2019). Dermatophytes account for 70% of cases of onychomycosis and are highly specialized fungi in their ability to degrade *keratinized tissues such as skin, hair, and nails*. Among the prevalent groups, *Trichophyton rubrum* is the most isolated, followed by the *T. mentagrophytes complex* and, *Epidermophyton floccosum* (Gupta et al., 2020a). Recently, several studies have shown the increasing incidence of yeasts of the genus *Candida*, including the species *C. albicans* and *C. parapsilosis*, as well as other filamentous non-dermatophytes such as *Scopulariopsis brevicaulis*, *Acremonium* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Neoscytalidium* (Andres and Alexandro 2020; Rather et al. 2021; Gupta et al. 2020b), of single or mixed occurrence (Tamer and Yuksel, 2019). In infections of mixed etiology, interactions between species promote the production of several metabolites and virulence factors, such as hydrolytic enzymes, with a self-regulatory function on morphogenesis, growth, and biofilm formation. These mechanisms ensure the survival of these

microorganisms in this environment, evading the action of antifungal drugs and the host's immune response (Gaurav et al. 2021; Gupta and Stec 2019).

Mixed infections in onychomycosis contribute to therapeutic failures leading to recurrence and recalcitrance (Brescini et al. 2021). Added to this, the scarce antifungal arsenal for the treatment of fungal diseases and the biological changes in drug susceptibility have constituted a challenge for controlling onychomycosis (Gupta and Stec 2019).

Considering the increase of onychomycoses caused by different species of fungi, knowledge of the competitive interactions between microorganisms constitutes a new challenge for new scenarios of therapeutic approaches for the treatment of onychomycosis (Lemes et al., 2021a; Tian et al. 2021). The present study aimed to evaluate the antifungal activity of extracts from pure and mixed cultures of *Candida parapsilosis*, *Trichophyton mentagrophytes*, and *Trichophyton rubrum* against strains of *Trichophyton* spp.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms: Strains of *Candida parapsilosis*, *Trichophyton mentagrophytes*, and *Trichophyton rubrum* of the collection of the Microbiology Laboratory of the School of Medicine (FAMERP), São José do Rio Preto, Brazil – FAMERP, São Paulo, Brazil, and the American Type Culture Collection (*T. mentagrophytes* 11481 TMATCC) and the Centraalbureau voor Schimmelcultures (*T. rubrum* 118892 TRCBS) were used. All isolates were registered in the National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SisGen) under protocol number AF41CDD.

Extracts: The culture extract of *C. parapsilosis* was prepared with colonies growth on Sabouraud Agar (ASD) and incubated at 35°C for 24 hours. A 5 mL inoculum suspension in sterile saline (0.85%), with turbidity corresponding to MacFarland scale 10, was inoculated into 500 mL of Sabouraud Dextrose Broth (CSD) and incubated at 35° C for 72 hours. To obtain pure culture extract of *T. mentagrophytes* (TM) and *T. rubrum* (TR), colonies of dermatophytes with seven days of growth at 35° C on Potato Dextrose Agar were covered with sterile saline. Subsequently, the mixture of conidia and hyphae was transferred to 500 mL of CSD and incubated at 35° C for 120 hours. To prepare extracts from mixed cultures (CPTM/CPTR) 5mL of inoculum suspension of *C. parapsilosis* and *Trichophyton* spp. were transferred to 500 mL of CSD and incubated at 35°C for 120 hours.

Susceptibility profile of dermatophyte strains against extracts and antifungal drugs:

The susceptibility profile of *T. rubrum* strains to extracts and drugs was determined by

microdilution technique according to the protocol described in document M38-3rd of the Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI), with modifications (CLSI 2017). The dermatophytes were cultivated on Potato Dextrose Agar at 35° C for seven days. After this period, the colony's surface covered with 5 mL of sterile saline (0.85%) was scraped with a sterile loop. The inoculum was adjusted in a spectrophotometer reading at 530 nm, followed by dilution at a 1:50 ratio in RPMI – 1640 medium (Sigma-Aldrich® - Rosen Park Media Institute) with a final concentration of 0.4 to 5 x 10⁴ cells/mL. Subsequently, 0.1 mL of the inoculum suspension was inoculated into 96-well polystyrene plates containing RPMI-1640 medium at different extract concentrations (4000 – 1.9 µg/mL) and tested drugs: itraconazole 4 – 0, 06 µg/mL, fluconazole and terbinafine 64 – 0.001 µg/mL. Sterility control wells (containing 0.2 mL of RPMI) and growth controls (containing inoculum and RPMI only) were prepared. Plates were incubated at 35°C for 120 hours. The MIC of the drugs for fluconazole and itraconazole was determined as the lowest concentration capable of inhibiting 80% of fungal growth (MIC80); for the extracts and terbinafine, the concentration capable of inhibiting 100% (MIC100) was considered. For the minimum fungicidal concentration (MFC), an aliquot of each well of the plates prepared with extracts and inoculum was transferred to Petri plates containing Sabouraud Dextrose Agar. The CFM was defined as the lowest concentration of the extract to inhibit visible growth on a solid medium. All tests were performed in triplicate.

Time Kill assay: The time-kill assay was conducted according to the method described by Klepser et al. (1998) with *Trichophyton* spp. For this assay, 2XMIC values obtained by broth microdilution were used. The dermatophyte inoculum was prepared as described previously. Suspensions of 0.1 mL of conidia were added to 4.9 mL of Sabouraud Dextrose Broth (CSD), obtaining a final concentration corresponding to 0.4 to 5 x 10⁴ colony forming units (CFU/mL). After preparing the inoculum, a 1:1 dilution was performed (0.2 mL of the extract with 0.2 mL of the inoculum). Tubes containing only inoculum were included for evaluation of growth control. At predetermined times (8, 24, 48h), an aliquot of 30 µl was taken from each sample and transferred to Agar Sabouraud Dextrose (DFCO®) plates with a Drigalski loop and incubated at 35° C for 120h. Subsequently, the number of colony-forming units (CFU) was counted. The percentage of inhibition was calculated by comparison with the growth control using the colony counting method (Klepser et al. 1998).

Toxicity test with *Galleria mellonella*: The toxicity test of the extracts was performed on larvae of the experimental model of toxicity *G. mellonella* according to the protocol described by Ignasiak and Maxwell (2017). Five larvae of *G. mellonella* (275 ± 25 mg) in the sixth instar of development were separated in Petri dishes (90x15 mm) for each condition. The artificial inoculation was performed by injecting 5 μ L of extracts using a Hamilton micro syringe for gas chromatography model 7000.5 KH, 10 μ L at 2000 μ g/mL concentrations. The experiment controls were untouched larvae (naïve), larvae inoculated with 10% ethanol (positive toxicity control), and 10% DMSO (negative toxicity control). Inoculated larvae were deprived of feed and direct light, incubated at 37 °C, and scored for viability at 24-h intervals for 5 days. Differences in resulting survival plots were evaluated using the Origin software using the Mantel–Cox test (Log-rank method) (Ignasiak and Maxwell, 2017).

RESULTS

Antimicrobial susceptibility profile of dermatophyte strains to antifungal drugs and extracts: The results for the susceptibility profile of dermatophyte strains against antifungal drugs are shown in Table 1. MIC values for fluconazole ranged from 2 – 32 μ g/mL. The highest values were found for the *T. mentagrophytes* strains - TM5094, TM6084, and TM6007 (32 μ g/mL) - and the lowest for the *T. rubrum* strains - TRCBS, TR7604, TR7984 (2 μ g/mL). Itraconazole values ranged from 0.5 to 2 μ g/mL, higher for the TM5094 strain (2 μ g/mL) and lower for TRCBS (0.25 μ g/mL). For terbinafine, the highest MIC value found was for the clinical strain TR7259 (64 μ g/mL); the other strains had a value of 0.03 μ g/mL.

The MIC values found for the extracts ranged from 250 – 8000 μ g/mL. A range of lower values was observed in the extracts CP against *T. rubrum* and CPTM against *T. mentagrophytes* and *T. rubrum* strains (250 and 500 μ g/mL). In contrast, a higher MIC range was observed for CPTR and TR extracts (1000 – 8000 μ g/mL). CFM values followed this trend, with smaller intervals for CPTM (250 and 1000 μ g/mL) and CP (500 and 1000 μ g/mL). CPTR and TR extracts showed a frequency of higher CFM values (2000 – 8000 μ g/mL) (Table 2).

In the geometric mean values, MICs, and CFMs, the CP extract showed the best action against *T. rubrum* and *T. mentagrophytes*, 885 and 1284 μ g/mL, respectively. TM and

CPTM extracts show the second best action with a geometric mean of 1557 and 1577 µg/mL for MICs. The lowest performance of antifungal activity was observed in CPTR and TR with values of 3035 and 2883 µg/mL for MICs and 4157 µg/mL for CFMs (Table 3).

Time-kill assay: The time-kill assay was carried out for 48 hours, exposing the strains TRCBS, TR6185, TMatCC, and TM5094 to the extracts. Graphs were drawn between the logarithmic number of CFU/mL and time (Graphs 1 - 4).

The maximum reduction in CFU/mL for dermatophyte was observed at 48h, with an inhibition rate of 100%, compared to the growth control. CP, TR, and CPTR extracts showed the fastest time of reduction for all dermatophyte strains (8 hours), followed by CPTM (24 hours) (Table 10).

Toxicity test with *Galleria Mellonella*: Toxicity tests on *G. mellonella* show that CP, TR1, and CPTM extracts tested at concentrations of 2000 µg/mL were not toxic, allowing the survival of 100% of the injected larvae. The survival rate for TM and CPTR extracts was 80% (Graph 5).

DISCUSSION

The change in the epidemiological profile of onychomycosis, associated with a low response to antifungal treatment, points to the chronic prevalence of these infections (Gupta et al. 2020b). Factors related to the pathogen, adaptability to the host, production of virulence factors, variation in susceptibility to drugs, different resistance systems, or to the host, with differences in immune response and low adherence to prolonged treatment, can explain that. Additionally, pharmacodynamic and pharmacokinetic characteristics related to drugs are considered, with changes in action and absorption (Leung et al. 2019). In a study carried out by Gaurav and collaborators (2021) on recalcitrant dermatophytoses, the chronicity was attributed to the irrational use of antifungals and the practice of sports in hot and humid weather, favoring the persistence and survival of dermatophytes in the skin and its annexes. In that study, 80% of the isolates showed resistance to terbinafine and 66% to fluconazole (Gaurav et al. 2021).

Case reports of onychomycosis caused by *Candida*, FFNDs, and *Trichophyton* spp. have been frequent in recent years, as evidenced by laboratory clinic. Analysis by direct microscopy often identifies positivity for fungus with two or more different structures (hyphae and yeast). However, with non-corresponding culture, fungal growth is observed for a single species (Gómez-Sáenz and Arenas 2020; Youssef et al. 2018).

Identification of the causal agent is essential for therapeutic success since antifungal drugs predominantly used for therapy against dermatophytes have suboptimal action for other etiological groups (Lipner et al. 2021). Terbinafine, for example, is mainly inactive against *Candida* yeasts and has a limited activity for use as monotherapy in onychomycosis caused by FFNDs. Fluconazole is active against many species of *Candida* spp. (except *C. glabrata*, *C. krusei* and *C. parapsilosis*). However ineffective against FFNDs. Itraconazole shows modest action against *Scopulariopsis* spp. and *Fusarium* spp., critical etiological agents of this group (Sonthalia and Goldust 2019).

In a global survey carried out by Gupta and collaborators of cases of mixed infections, the high prevalence of FFNDs and dermatophytes was highlighted with rates of 39%. In Brazil, Canada, and Israel, the rates of mixed infections were 61%, 34%, and 22%, respectively, with isolation of *Aspergillus* spp., *Scopulariopsis* spp., and *Fusarium* spp. The presence of an FFND can significantly contribute to therapeutic failure or longer healing time (2 – 4 years) (Gupta et al. 2020a).

The biological interference between the dermatophytes *T. mentagrophytes* and *T. rubrum* with yeasts of the genus *Candida* when cultivated in a solid medium was demonstrated by Lemes et al. The anti-*Trichophyton* activity from extracts produced from pure cultures of *Candida* spp. corroborates the microbial interference growth (Lemes et al. 2021a; Lemes et al. 2021b). The current study showed mixed culture extracts also have antifungal action against dermatophytes, evidencing the presence of antifungal compounds in these cultures. The individual biological characteristics of each strain justify the differences in MIC value since the strains originate from different sources of infection. The unstable environment causes the adaption and response with biological changes as a defense or tolerance mechanism.

The change in susceptibility profile from sensitive to resistant is also an essential factor for biological events. Epidemiological data reported by Mesini and collaborators show the increased incidence of infections by fluconazole-resistant strains of *C. parapsilosis* (Mesini et al. 2020). Studies by Silva and collaborators corroborate this statement, and

60 and 65% of the isolates were resistant to itraconazole and fluconazole, respectively (Silva et al. 2020). In an extensive review of the emergence of terbinafine-resistant dermatophytes, Shen and colleagues reported elevated MICs for *T. rubrum*, *T. interdigitale*, and *T. mentagrophytes*, including evidence of changes in target proteins for treatment-resistant ones (Shen et al. 2022). In the present study, 83% of the *T. mentagrophytes* strains showed resistance to fluconazole and itraconazole. For *T. rubrum*, 83% and 14% of the strains showed a dose-dependent profile for itraconazole and fluconazole, respectively. Resistance to terbinafine was evidenced only for TR7259.

In the anatomical niche of nails, mixed interactions of microorganisms promote the production of essential metabolites for their survival, with a variety of virulence factors such as proteases, lipases, and biofilm formation, in addition to resistance to host immune responses or drug action. In this context, Mohammadi et al., analyzing the virulence profile of *Candida* species isolated from nails, observed significant correlations between the minimum inhibitory concentration (MIC) of fluconazole/itraconazole and biofilm production (Mohammadi et al. 2020). The study coordinated by Oliver and collaborators on chemical profiles of metabolites showed a variety of molecules produced by species of *Candida* spp., isolated from different sources of infection. In this study, 66 different metabolites were identified. These metabolic pathways are mainly related to energy production and virulence mechanisms (Oliver et al. 2020). Although the compounds in the extracts have not been identified, the antifungal action described here opens possibilities for new therapeutic approaches to control onychomycosis.

The kinetics of death assay provides information on the microbicidal action dynamics of the tested compounds, an essential tool for an antimicrobial analysis of potential antifungal compounds (Bax et al. 2017). The ability of extracts to inhibit fungal growth shows the fungicidal characteristic against *T. mentagrophytes* and *T. rubrum* strains, with maximum inhibition within 48 hours. The toxicity tests on *G. mellonella* show the extracts' non-toxicity at concentrations of 2000 - 8000 µg/mL, with the survival of 80 - 100% of the larvae injected with the compounds. The use of *Galleria mellonella* for toxicity tests has gained attention from the scientific community in recent years. Compared to traditional mammalian models, it has certain advantages, such as being easy to obtain for large-scale experiments, simple and easy to handle, without the need for special equipment, and exemption from approval by research ethics committees (Junqueira et al. 2021). The similarity with the innate immune response of mammals

having cellular and humoral defenses should also be highlighted. Additionally, it is possible to establish the dosage of potential drug candidates in mammals.

The extracts of pure and mixed culture of *Candida parapsilosis* and dermatophytes present antifungal activity against *T. mentagrophytes* and *T. rubrum*, which may influence the laboratory diagnosis of mixed infections. These results can explain cases of mixed fungal infections where only one of the etiologic agents grows in culture. Furthermore, isolating and identifying the extracts compounds may allow new therapeutic approaches to control fungal infections.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like the financial support of the National Council for the Improvement of Higher Education (CAPES) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for the scholarships granted. We acknowledge the Multi-user Laboratory (LMU) at São Jose do Rio Preto (Famerp).

STATEMENTS & DECLARATIONS: Funding not applicable.

LITERATURE CITED

Andrés TS, Alexandro B. 2020. *Candida* Onychomycosis: an Old Problem in Modern Times. Current Fungal Infection Reports 14(3):209–216.

Bax HI, Bakker-Woudenberg IAJM, de Vogel CP, van der Meijden A, Verbon A, de Steenwinkel JEM. 2017. The role of the time-kill kinetics assay as part of a preclinical modeling framework for assessing the activity of anti-tuberculosis drugs. Tuberculosis (Edinb) 105:80-85.

Brescini L, Fioriti S, Morroni G, Barchiesi F. 2021. Antifungal Combinations in Dermatophytes. Journal of Fungi 7(9):727.

CLSI. 2017. M38 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, 3rd Edition. 62 p.

Gaurav V, Bhattacharya SN, Sharma N, Datt S, Kumar P, Rai G, Singh PK, Taneja B, Das S. 2021. Terbinafine resistance in dermatophytes: Time to revisit alternate antifungal therapy. *Journal of Medical Mycology* 31(1):101087.

Gupta AK, Stec N. 2019. Recent advances in therapies for onychomycosis and its management. *F1000Research* 25(8):F1000FacultyRev-968.

Gupta AK, Taborda VBA, Taborda PRO, Shemer A, Summerbell RC, Nakrieko KA. 2020a. High prevalence of mixed infections in global onychomycosis. *PLoS One* 15(9):e0239648.

Gupta AK, Stec N, Summerbell RC, Shear NH, Piguet V, Tosti A, Piraccini BM. 2020b. Onychomycosis: a review. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 34(9):1972-1990.

Gómez-Sáenz A; Arenas R. 2020. Mixed Onychomycosis: A Case Report Caused by *Trichophyton rubrum*, *Fusarium* sp. and *Candida albicans*. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica* 18(1). 48-50.

Ignasiak K, MAXWELL A. 2017. *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. *BMC Research Notes* 29(1):428.

Junqueira JC, Mylonakis E, Borghi E. 2021. *Galleria mellonella* experimental model: advances and future directions. *Pathogens and disease* 79(5):ftab021.

Klepser ME, Ernst EJ, Lewis RE, Ernst ME, Pfaller MA. 1998. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42(5):1207–1212.

Lemes TH, Torrezan GS, Polaquini CR, Regasini LO, Almeida BG, Brizzotti-Mazuchi NS, Ribeiro MD, Maschio-Lima T, Caetano MH, Pattini VC et al. 2021a. *In vitro* antifungal activity of *Candida* culture extracts against *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. *Brazilian Journal of Case Reports* 01(4):135-152.

Lemes TH, Maschio-Lima T, Brizzotti NS, Siqueira JPZ, Almeida MTG. 2021b. O estudo da interferência biológica entre dermatófitos e leveduras em onicomicoses. *International Journal of Health Science – PDVS* 1:75-86.

- Leung AKC, Lam JM, Leong KF, Hon KL, Barankin B, Leung AAM, Wong AHC. 2020. Onychomycosis: An Updated Review. *Onychomycosis: An Updated Review. Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery* 14(1):32-45.
- Lipner SR, Joseph WS, Vlahovic TC, Scher RK, Rich P, Ghannoum M, Daniel CR, Elewski B. 2021. Therapeutic Recommendations for the Treatment of Toenail Onychomycosis in the US. *Journal of Drugs in Dermatology* 20(10):1076–1084.
- Mesini A, Mikulska M, Giacobbe DR, Del Puente F, Gandolfo N, Codda G, Orsi A, Tassinari F, Beltramini S, Marchese A et al. 2020. Changing epidemiology of candidaemia: Increase in fluconazole-resistant *Candida parapsilosis*. *Mycoses* 63(4):361-368.
- Mohammadi F, Ghasemi Z, Familsatarian B, Salehi E, Sharifynia S, Barikani A, Mirzadeh M, Hosseini MA. 2020. Relationship between antifungal susceptibility profile and virulence factors in *Candida albicans* isolated from nail specimens. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 7(53):e20190214.
- Oliver JC, Laghi L, Parolin C, Foschi C, Marangoni A, Liberatore A, Dias ALT, Cricca M, Vitali B. 2020. Metabolic profiling of *Candida* clinical isolates of different species and infection sources. *Scientific Reports* 10(1):16716.
- Silva SL, Lima ME, Santos RDT; Neto HD, Silva DF, Lima EO. 2020. Antifungal sensitivity profile of clinical isolates obtained from onychomycosis to conventional antifungals. *Research, Society and Development* 9(8):e561985775.
- Sonthalia S, Goldust M. 2019. Innovative Physical Approaches for Onychomycosis: Peeling, Lasers and Beyond. *Skin Appendage Disorders* 5(4):197-200.
- Tamer F, Yuksel ME. 2019. Onychomycosis due to mixed infection with non-dermatophyte molds and yeasts. *Our Dermatol Online* 10(3):267-269
- Tian X, Ding H, Ke W, Wang L. 2021. *Quorum Sensing* in Fungal Species. *Annual Review of Microbiology* 8(75):449-469.
- Rather S, Keen A, Shah, FY, Yaseen A, Farooq S, Bakhshi A. 2021. Candidal Onychomycosis: Clinicoepidemiological Profile, Prevailing Strains, and Antifungal

Susceptibility Pattern-A Study from a Tertiary Care Hospital. Indian Journal of Dermatology 66(2):132–137.

Shen JJ, Arendrup MC, Verma S, Saunte DML. 2022. The emerging terbinafine-resistant *Trichophyton* epidemic: What Is the Role of Antifungal Susceptibility Testing? Dermatology 238(1); 60-79.

Youssef AB, Kallel A, Azaiz Z, Jemel S, Bada N, Chouchen A, Belhadj-Salah N, Fakhfakh N, Belhadj S, Kallel K. 2018. Onychomycosis: Which fungal species are involved? Experience of the Laboratory of Parasitology-Myecology of the Rabta Hospital of Tunis. Journal de Mycologie Medicale 28(4):651-654.

Table 1. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values of the drugs fluconazole, itraconazole and terbinafine against dermatophyte strains.

	MIC (µg/mL)		
	Fluconazole	Itraconazole	Terbinafine
TMATCC	4	0.5	0.03
TM5094	32	2	0.03
TM5419	16	1	0.03
TM6007	32	1	0.03
TM6085	32	1	0.03
TM7389	16	1	0.03
TRCBS	2	0.25	0.03
TR6185	4	0.5	0.03
TR6195	4	0.5	0.03
TR6284	4	0.5	0.03
TR7259	32	0.5	64
TR7604	2	0.5	0.03
TR7984	2	0.5	0.03

Table 2. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) range and Minimum Fungicide Concentration (MFC) values of extracts against dermatophyte strains.

MIC (µg/mL)						
	TMATCC	TM5094	TM5419	TM6007	TM6085	TM7389
CP	1000 - 2000	1000 - 2000	1000 - 2000	1000 - 2000	1000 - 2000	1000 - 2000
CPTM	250 - 8000	250 - 8000	500 - 8000	250 - 8000	250 - 8000	250 - 8000
CPTR	2000 - 8000	4000 - 8000	4000 - 8000	4000 - 8000	4000 - 8000	4000 - 8000
TM	1000 - 8000	2000 - 8000	1000 - 8000	1000 - 8000	1000 - 8000	1000 - 8000
TR	2000 - 8000	2000 - 8000	4000 - 8000	4000 - 8000	4000 - 8000	4000 - 8000

MIC (µg/mL)						
	TRCBS	TR6185	TR6195	TR6284	TR7604	TR7984
CP	500 - 2000	500 - 2000	500 - 2000	250 - 500	500 - 2000	250 - 2000
CPTM	250 - 8000	250 - 8000	250 - 8000	250 - 1000	500 - 8000	250 - 8000
CPTR	2000 - 4000	2000 - 8000	2000 - 4000	1000 - 2000	2000 - 4000	2000 - 4000
TM	1000 - 4000	1000 - 8000	2000 - 8000	250 - 2000	1000 - 8000	250 - 4000
TR	1000 - 4000	1000 - 8000	2000 - 8000	1000	2000 - 8000	1000 - 8000

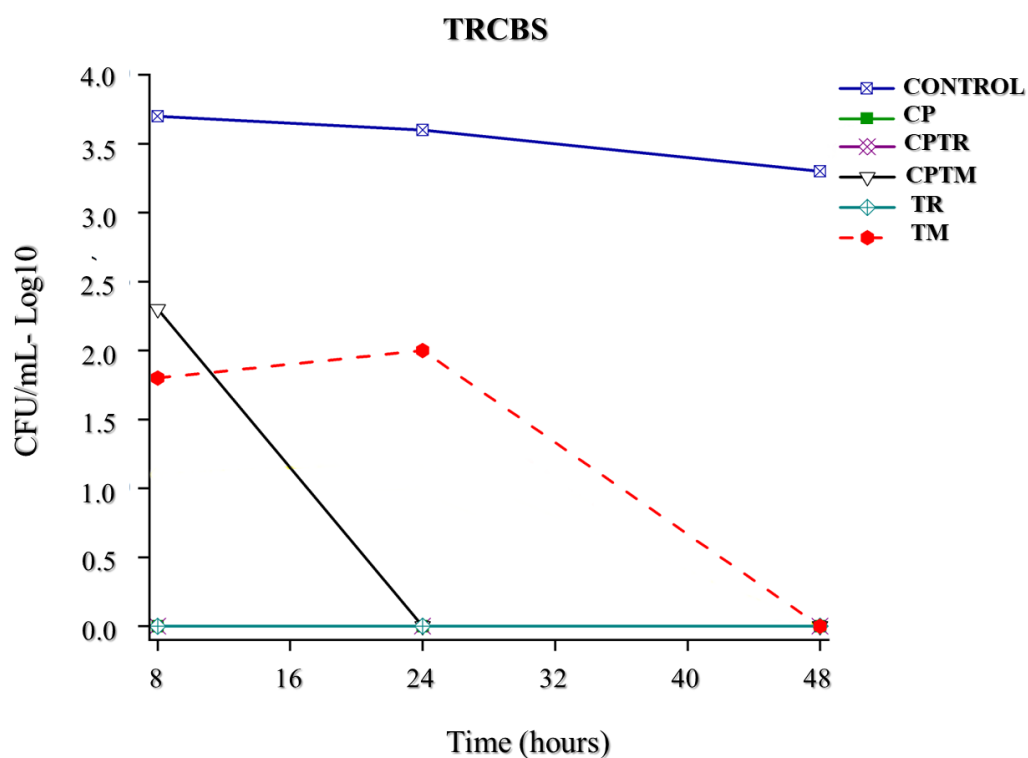
MFC (µg/mL)						
	TMATCC	TM5094	TM5419	TM6007	TM6085	TM7389
CP	1000 - 2000	1000 - 2000	1000 - 2000	1000 - 2000	1000 - 2000	1000 - 2000
CPTM	500 - 8000	500 - 8000	500 - 8000	500 - 8000	1000 - 8000	500 - 8000
CPTR	4000 - 8000	4000 - 8000	4000 - 8000	4000 - 8000	4000 - 8000	4000 - 8000
TM	1000 - 8000	2000 - 8000	2000 - 8000	1000 - 8000	1000 - 8000	1000 - 8000
TR	2000 - 8000	4000 - 8000	4000 - 8000	4000 - 8000	4000 - 8000	4000 - 8000

MFC (µg/mL)						
	TRCBS	TR6185	TR6195	TR6284	TR7604	TR7984
CP	1000 - 2000	1000 - 2000	1000 - 2000	1000 - 2000	500 - 1000	500 - 2000
CPTM	250 - 8000	250 - 8000	500 - 8000	500 - 4000	500 - 8000	500 - 8000
CPTR	2000 - 4000	2000 - 8000	2000 - 8000	2000	4000	2000 - 4000
TM	1000 - 4000	1000 - 8000	2000 - 8000	1000 - 4000	2000 - 4000	1000 - 4000
TR	1000 - 8000	2000 - 8000	2000 - 8000	1000 - 4000	4000 - 8000	2000 - 4000

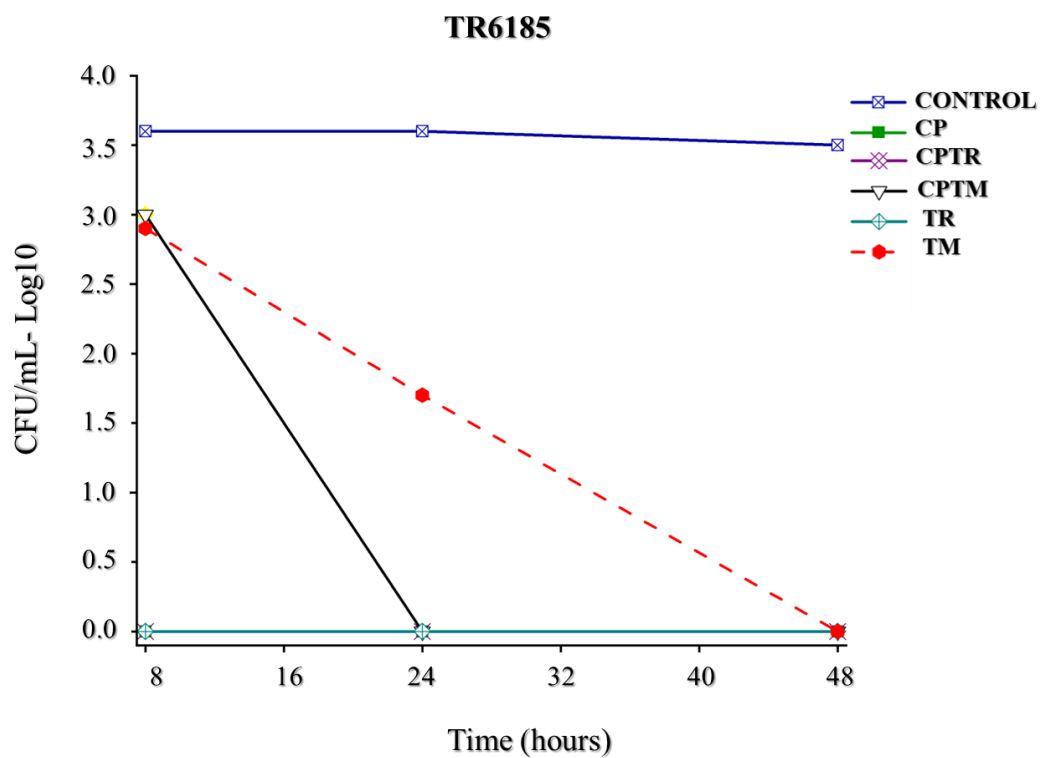
Table 3. The geometric mean of the MIC and CFM values of the extracts against the dermatophyte strains.

Geometric mean ($\mu\text{g/mL}$)						
	TR		TM		TR/TM	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
CP	689	1212	1137	1361	885	1284
CPTM	1414	1714	1759	2619	1577	2119
CPTR	2245	3429	4104	5040	3035	4157
TM	1343	2245	1805	3299	1557	2722
TR	2133	3429	3899	5040	2883	4157

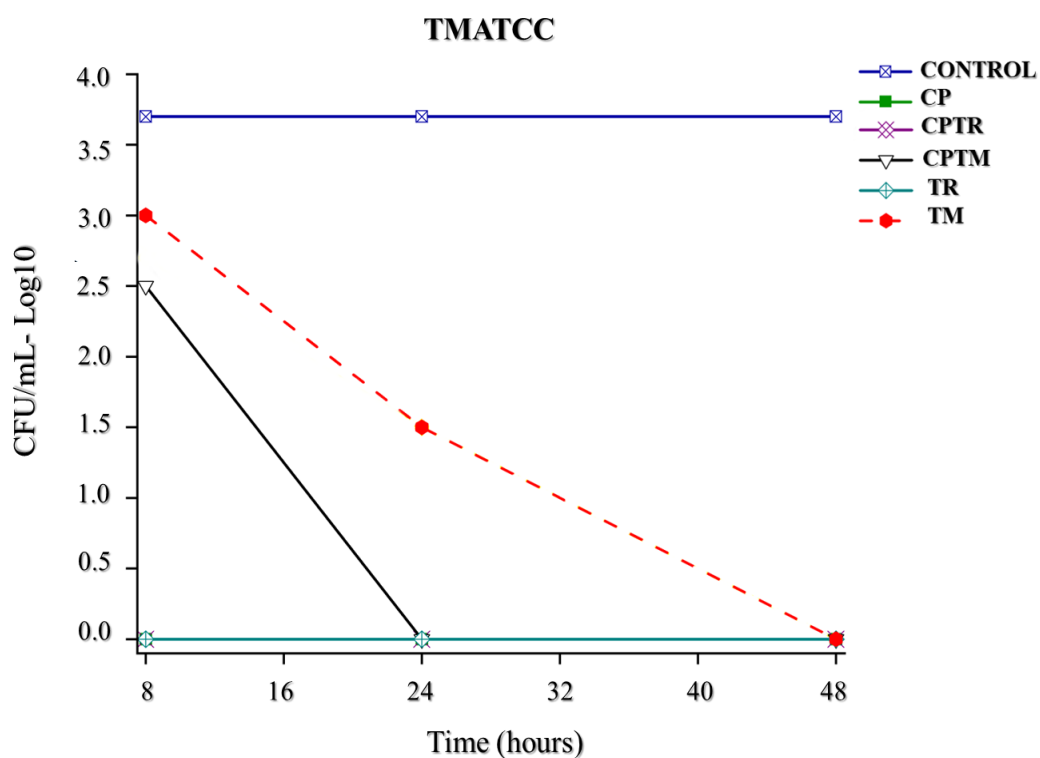
Graph 1. Graphical representation of the kinetics TRCBS death in contact with the extracts.



Graph 2. Graphical representation of the kinetics TR6185 death in contact with the extracts.



Graph 3. Graphical representation of the kinetics TMATCC death in contact with the extracts.



Graph 4. Graphical representation of the kinetics TM5094 death in contact with the extracts.

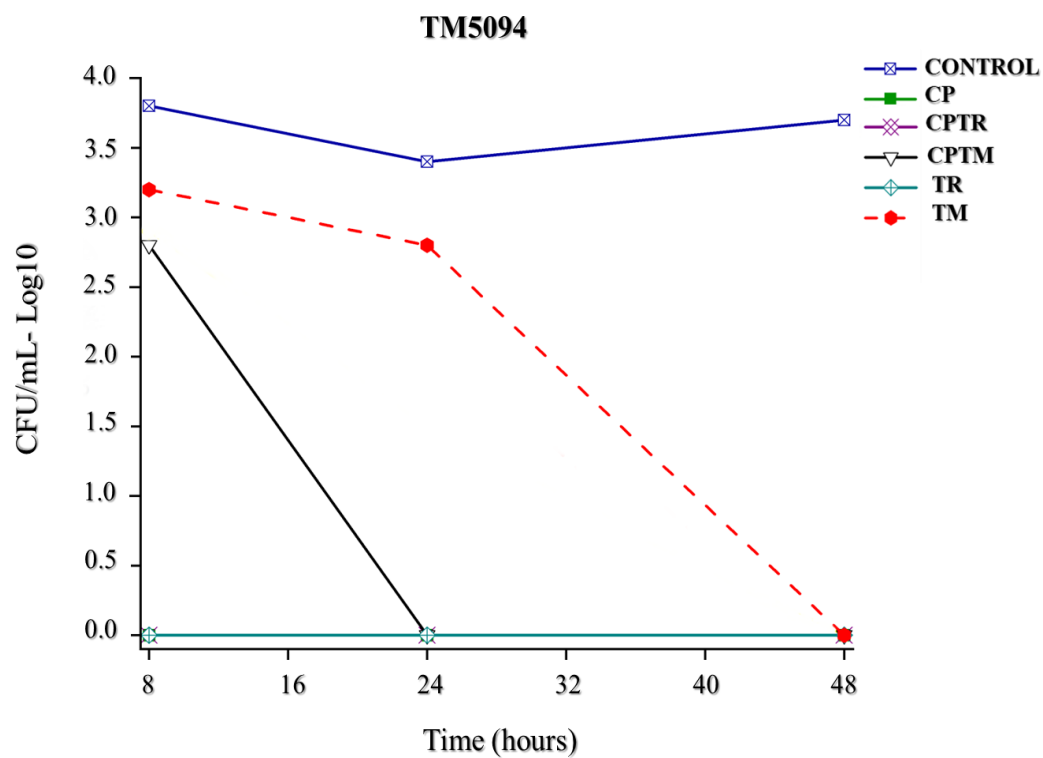
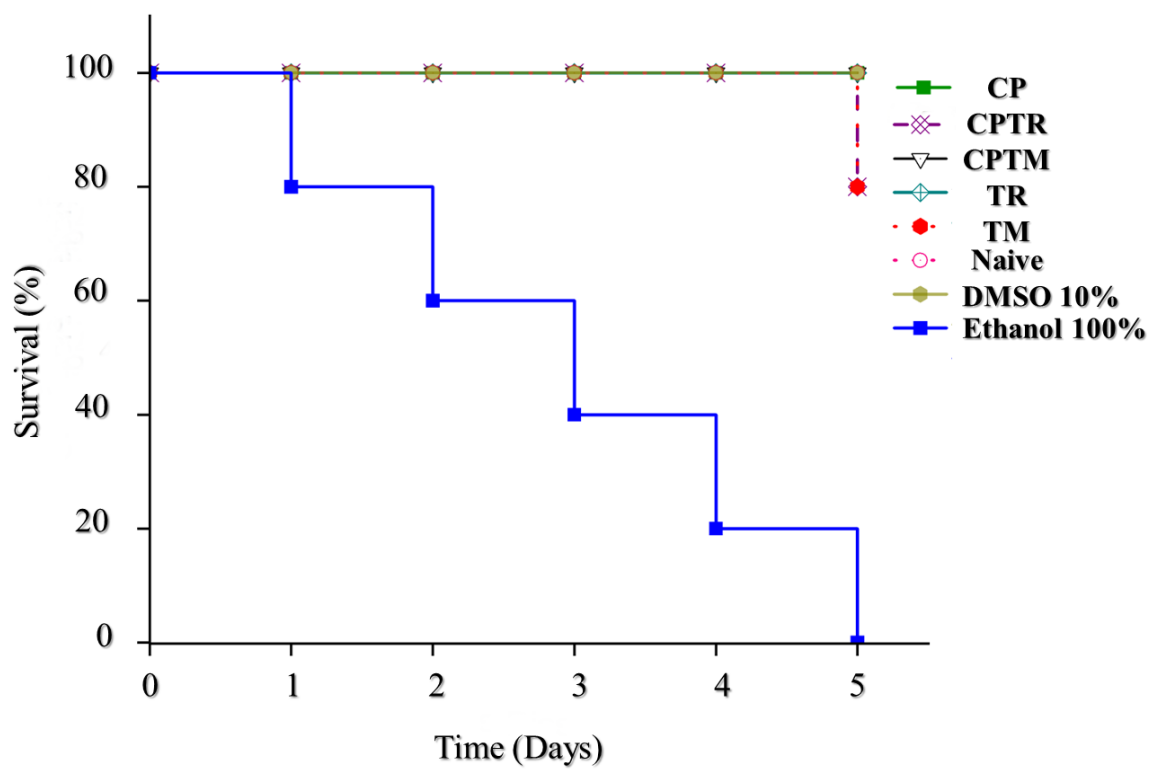


Table 10. The colony forming unit (CFU/mL) of dermatophyte strains exposed to extracts at different times.

TRCBS				TR6185			
	8 hours	24 hours	48 horas		8 hours	24 hours	48 hours
CONTROL	5083	3812	1955	CONTROL	3957	4258	3450
CP	0	0	0	CP4	0	0	0
CPTR	0	0	0	CP4TR1	0	0	0
CPTM	183	0	0	CP4TM3	1117	0	0
TR	0	0	0	TR1	0	0	0
TM	67	100	1	TM3	817	54	1
TMATCC				TM5094			
	8 hours	24 hours	48 hours		8 hours	24 hours	48 hours
CONTROL	5173	5465	5217	CONTROL	5971	2745	4753
CP	0	0	0	CP4	0	0	0
CPTR	0	0	0	CP4TR1	0	0	0
CPTM	283	0	0	CP4TM3	667	0	0
TR	0	0	0	TR1	0	0	0
TM	1000	33	0	TM3	1533	633	0

Graph 5. Representation of survival (%) of *Galleria mellonella* larvae exposed to extracts with monitoring at 24-hour intervals for five days.



10. ARTIGO IV

Ação inibitória de metabólitos extraídos de cultura de *Candida parapsilosis* contra *Microsporum canis*

LEMES, THIAGO HENRIQUE¹; SILVA, JULYANNA ANDRADE¹; REGASINI LUÍS OCTÁVIO¹; BRIZZOTTI, NATALIA SERON²; ALMEIDA, BIANCA GOTTARDO¹; RIBEIRO, MARIELA DOMICIANO²; MASCHIO-LIMA, TAIZA¹; SIQUEIRA, JOÃO PAULO ZEN²; MOZANER, LETÍCIA DE QUEIROZ¹; ALMEIDA, MARGARETE TERESA GOTTARDO².

¹Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Humanas e Ciências Exatas (Ibilce), Câmpus São José do Rio Preto – Brasil.

²Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP – FAMERP.

Resumo publicado como capítulo de livro: CIÊNCIAS DA SAÚDE: ESTUDOS PARA MANUTENÇÃO E MELHORIA DA VIDA – VOLUME IV. ISBN 65-86-072. DOI

INTRODUÇÃO: O dermatófito zoofílico *Microsporum canis* é agente causador de infecções do couro cabeludo (*tinea capitis*), pele (*tinea corporis*) e unhas (onicomicoses). Sua distribuição em todo mundo é variada e está diretamente relacionada a fatores ambientais e epidemiológicos. Leveduras do gênero *Candida* são conhecidas por pertencerem a microbiota humana no trato urinário, respiratório ou gastrointestinal, porém no desequilíbrio parasito-hospedeiro, podem causar infecções fúngicas graves. Nesse contexto, *C. parapsilosis* surge como patógeno emergente em infecções superficiais e em alguns casos pode aparecer concomitantemente associadas a infecções por dermatófitos. Nesse ambiente de interação entre as espécies, metabólitos são gerados com impactos sobre crescimento, esporulação e até formação de biofilmes nas populações microbianas. Nos últimos anos, infecções por *M. canis* recalcitrantes e linhagens resistentes aos antifúngicos convencionais têm se tornado frequentes. Adicionalmente, o escasso arsenal antifúngico para o tratamento, além dos efeitos colaterais como danos hepatotóxicos ou nefrotóxicos causados pelo uso prolongado desses fármacos, tornam essas infecções de difícil controle. Diante disso, é importante o rastreamento desses metabólitos para que futuramente tornem-se possíveis alternativas para novas abordagens no controle de infecções fúngicas.

OBJETIVO: O presente estudo avaliou, in vitro, o potencial antifúngico do extrato de cultura pura de *Candida parapsilosis* sobre linhagens de *Microsporum canis*.

METODOLOGIA: Para o estudo foram utilizadas linhagens de, pertencentes ao Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, Brasil. As linhagens de *C. parapsilosis* foram repicadas em Ágar Sabouraud e incubadas 30° C por 24 horas. Após esse período, inóculos na escala 10 de MacFarland foram preparados em 500 mL de caldo Sabouraud e incubados em estufa 30° C por 72 horas. Os meios de cultura contendo os inóculos foram filtrados em membrana millipore 0,2 µm e submetidas à extração líquido-líquido, utilizando-se acetato de etila como contra-fase. O procedimento foi repetido três vezes, permitindo a extração total dos metabólitos fúngicos dos meios de cultura. A fase acetato de etila foi submetida a evaporador rotativo para secagem. O composto resultante em massa foi solubilizado em solução de água destilada estéril com dimetil sulfoxido (DMSO) a 10%. Testes para obtenção da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram realizados com linhagens de

M. canis seguindo se as recomendações do documento *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M38- A2*.

RESULTADOS: Valores de CIM obtidos contra as linhagens clínicas de *M. canis* variaram de 250 – 500 ug/mL.

CONCLUSÃO: O extrato de *C. parapsilosis* apresenta atividade antifúngica sobre *M. canis*. Futuramente o isolamento e identificação dos compostos do extrato possibilitarão novas abordagens terapêuticas no controle de infecções causadas por esse patógeno.

11. CONCLUSÃO

Os extratos obtidos das culturas puras e mistas de *Candida parapsilosis*, *Trichophyton mentagrophytes* e *T. rubrum* apresentam atividade antifúngica contra linhagens de *Candida* spp e *Trichophyton* spp.

Correlacionando a ação do extrato de Caldo Sabouraud puro (CS), com os demais é possível inferir que, o extrato de *Candida parapsilosis* isolado (CP4) é o que apresenta melhor atividade antimicrobiana. Os extratos de culturas de *C. parapsilosis* com *T. mentagrophytes* (CP4TM3) e *T. mentagrophytes* puro (TM3) evidencia também atividade antifúngica superior à de CS. Entretanto, no extrato de culturas mistas de *C. parapsilosis* com *T. rubrum* (CP4TR1) nota-se o decréscimo dessa atividade, com valores de CIMs elevados. O mesmo ocorre para o extrato de culturas puras de *T. rubrum* (TR1). Nesse sentido, fica evidente a característica dominante de *T. rubrum* na interferência de ação inibitória. Tal efeito pode ser explicado por características individuais biológicas dessa linhagem quando em associação com outros microrganismos, o qual pode inibir a produção de compostos presentes nas culturas isoladas.

Considerando padrão microbiológico de infecções mistas, a interferência química de uma espécie sobre outra, aqui documentada, poderá comprometer diagnóstico laboratorial, com resultados falsos negativos.

O efeito sinérgico entre produtos biológicos e moléculas terapêuticas utilizadas para o controle de infecções fúngicas, abre novo potencial terapêutico, especialmente contra microrganismos resistentes. Acrescenta-se ainda que na vigência de intolerância ao tratamento antifúngico sistêmico, a utilização de terapêutica tópica em associação extratos e antifúngicos que atuam sobre membrana citoplasmática poderão promover a cura de infecções superficiais.

Considerando ausência de toxicidade e a cinética de morte, dentro de 48h, valoriza-se uma alternativa terapêutica futura, especialmente para casos de onicomicoses recalcitrantes.