

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DOUTORADO EM GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

**Francislene Juliana Martins**

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE COMPOSTOS DERIVADOS DO  
ÁCIDO CINÂMICO NO TRATAMENTO DA ONICOMICOSE**

JUIZ DE FORA  
2016

**FRANCISLENE JULIANA MARTINS**

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE COMPOSTOS DERIVADOS DO  
ÁCIDO CINÂMICO NO TRATAMENTO DA ONICOMICOSE**

Tese de Doutorado do curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Doutor em Genética e Biotecnologia.

**ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. NÁDIA REZENDE BARBOSA RAPOSO**

**JUIZ DE FORA**

**2016**

**FRANCISLENE JULIANA MARTINS**

**Atividade antifúngica de compostos derivados do ácido cinâmico  
no tratamento da onicomiose**

Tese de doutorado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Ênfase em Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nádia Rezende Barbosa Raposo (Orientadora)  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Michele Munk Pereira  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. Dr. Marcos Antônio Fernandes Brandão  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. Dr. Hudson Caetano Polonini  
Faculdade de Ciências Médicas - SUPREMA

---

Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira  
Universidade Federal do Pará

Dedico esse trabalho a minha querida e eterna mãe que, mesmo não estando presente fisicamente em mais essa conquista, foi e será sempre o meu suporte, o meu exemplo e a minha inspiração!

## **AGRADECIMENTO**

Agradeço a Deus por me fortalecer nessa jornada e me permitir vencer e à Santa Terezinha por me iluminar, proteger e abençoar todos os dias.

A minha mãe, Jane, que estará sempre ao meu lado, guiando-me e se alegrando com as minhas/nossas conquistas.

Ao meu pai, Francisco, por todo seu apoio e presença constante.

Ao meu marido, Rafael, por seu amor, companheirismo e compreensão. Por ajudar na parte química dos artigos, mesmo não sendo orgânico e, principalmente, por dividir comigo todos esses momentos de tristeza, insegurança, alegria e agora vitória.

A minha orientadora, amiga, Dra. Nádia, por ter me conduzido desde a graduação, confiando no meu trabalho e contribuindo para o meu desenvolvimento profissional e intelectual.

Ao amigo, parceiro e padrinho, César, por todo apoio durante essa longa caminhada. Mesmo sendo sacrificante, você não mediu esforços para não me deixar trabalhar sozinha nas madrugadas ou nos nossos dias de MEV, cansados, com medo e sem dinheiro na "cidade grande".

À Amanda e demais técnicas do Laboratório de Microscopia do Museu Nacional da UFRJ, por seu trabalho, ajuda, carinho e boa-vontade com nossas análises.

À Renata, amiga e madrinha, por sua ajuda e momentos de diversão.

À Luana Borba por sua solicitude, simpatia e orientações e à professora Sônia Rozental, por abrir as portas de seu laboratório para nós.

Aos amigos do Nupics, aos professores do Núcleo e a todos, que contribuíram para que esse dia chegasse, muito obrigada!

"... nada acontece que Deus não tenha previsto desde a eternidade."

Santa Terezinha

## RESUMO

O tratamento farmacológico da onicomicose é, geralmente, prolongado, pouco efetivo, de custo elevado e pode acarretar reações adversas. Em 25 % dos casos, essa terapia não apresenta resposta satisfatória. Todos esses fatores levam à busca por novos compostos para uso terapêutico. Dessa forma, este trabalho teve por objetivo avaliar a atividade antifúngica de cinamaldeído, eugenol e  $\alpha$ -metil-*trans*-cinamaldeído e desenvolver uma formulação para o tratamento contra os principais fungos causadores da onicomicose. Para tanto, foi avaliada a atividade antifúngica dos compostos, na concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$  frente a *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11481; *Fusarium oxysporum* ATCC 48112, *Fusarium solani* ATCC 36031, *Microsporum canis* ATCC 32903, *Microsporum gypseum* ATCC 14683, *Trichophyton rubrum* URM 1666 e *Epidermophyton floccosum* CCF-IOC-3757. Além disso, foi estabelecida a concentração inibitória mínima (CIM), entre 0,12 a 1000  $\mu\text{g/mL}$  para fungos filamentosos citados e *T. mentagrophytes* isolado clínico e 2,44 a 5000  $\mu\text{g/mL}$  para *Candida albicans* ATCC 10231 e *C. albicans* isolado clínico e a concentração fungicida mínima (CFM) frente as mesmas espécies. O cetoconazol, a terbinafina, o itraconazol e a anfotericina B foram utilizados como fármacos de referência. Para estes fármacos e o composto mais promissor, foram verificadas as alterações morfológicas provocadas sobre as linhagens testadas por meio de microscopia eletrônica de varredura. Além disso, foi avaliada a interferência com a atividade de fosfolipase em *C. albicans* e foi realizado o ensaio de toxicidade aguda com a utilização do bioindicador *Daphnia magna*. Do mesmo modo, foi avaliado o percentual de viabilidade celular sobre fibroblastos L 929, realizada a citometria de fluxo para avaliar as alterações sobre *F. oxysporum* e foi elaborada uma formulação com cinamaldeído a 2 %. Os resultados mostraram que o cinamaldeído foi eficaz contra todos os micro-organismos testados, sendo mais ativo que os demais compostos avaliados. Foi ativo contra *F. oxysporum*, *F. solani* e *E. floccosum*, que não foram inibidos pelos fármacos de referência e mais ativo frente a *T. rubrum*. As eletromicrografias mostraram que o cinamaldeído provocou alterações nas estruturas dos fungos filamentosos e da levedura, as quais podem ser indicativas de seu mecanismo de ação e provocou redução na atividade de fosfolipase em *C. albicans*. Nos ensaios de toxicidade aguda, o cinamaldeído foi considerado

moderadamente tóxico à *D. magna* e, abaixo de 1 µg/mL, não interferiu com a viabilidade celular em fibroblastos L 929. A citometria de fluxo mostrou que o cinamaldeído causou a redução na concentração de lipídios neutros, viabilidade celular e interferiu com a atividade mitocondrial de *F. oxysporum*. A formulação elaborada foi testada *in vitro* e inibiu *T. mentagrophytes*, *F. oxysporum*, *M. gypseum* e *C. albicans*. Os resultados obtidos são promissores, mas faz-se necessário verificar a permeabilidade do ativo na formulação e realizar os ensaios *in vivo*.

Palavras-chaves: Onicomicose. Antifúngicos. Cinamaldeído. Eugenol.  $\alpha$ -metil-*trans*-cinamaldeído.

## ABSTRACT

Pharmacological treatment of onychomycosis is usually extended, halfhearted, high cost and can bring adverse reactions. In 25 % of cases, this therapy has no satisfactory answer. All of these factors lead to the search for new compounds for therapeutic use. Thus, this study aimed to evaluate the antifungal activity of cinnamaldehyde, eugenol, and  $\alpha$ -methyl-*trans*-cinnamaldehyde and develop a formulation for the treatment against the main causative fungi of onychomycosis. It was evaluated the antifungal activity of compounds, at concentration of 1000  $\mu\text{g/mL}$  against *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11481; *Fusarium oxysporum* ATCC 48112, *Fusarium solani* ATCC 36031, *Microsporum canis* ATCC 32903, *Microsporum gypseum* ATCC14683, *Trichophyton rubrum* URM 1666 and *Epidermophyton floccosum* CCF-IOC-3757. In addition, it was established the minimum inhibitory concentration (MIC), between the 0.12 to 1000  $\mu\text{g/mL}$  for filamentous fungi cited and *Trichophyton mentagrophytes* clinical strain and 2.44 to 5000  $\mu\text{g/mL}$  for *C. albicans* ATCC 10231 and *C. albicans* clinical strain and minimum fungicide concentration (MFC) against the same strains. Ketoconazole, terbinafine, itraconazole and amphotericin B were used as reference drugs. For these drugs and the most promising compound, were observed morphological changes caused on the tested strains by means of scanning electron microscopy. Furthermore, interference with phospholipase activity in *C. albicans* was evaluated and the acute toxicity test was developed with the use of bio-indicator *Daphnia magna*. As well, cell viability percentage was measured on L 929 fibroblast, flow cytometry was performed to assess the changes of *F. oxysporum* and a formulation with 2 % cinnamaldehyde was developed. The results show that cinnamaldehyde was effective against all tested microorganisms, being more active than the other compounds evaluated. It was active against *F. oxysporum*, *F. solani* and *E. floccosum*, which were not inhibited by the reference drugs and more active against *T. rubrum*. The micrographs showed that cinnamaldehyde caused changes in the structure of filamentous fungi and yeast, which may be indicative of their mechanism of action and caused reduction of phospholipase activity in *C. albicans*. In acute toxicity tests, the cinnamaldehyde was considered moderately toxic to *D. magna* and below 1  $\mu\text{g/mL}$  did not interfere with cell viability in L 929 fibroblasts. Flow cytometry showed that

cinnamaldehyde caused reduction in the concentration of neutral lipids, cell viability and interfered with mitochondrial activity of *F. oxysporum*. The formulation prepared was tested *in vitro* and inhibited *T. mentagrophytes*, *F. oxysporum*, *M. gypseum* and *C. albicans*. The results are promising, but it is necessary to check the permeability of the active in the formulation and conduct *in vivo* testing.

Keywords: Onychomycosis. Antifungal agents. Cinnamaldehyde. Eugenol.  $\alpha$ -methyl-*trans*-cinnamaldehyde.

## LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS, QUADROS E TABELAS

Figura 1	Representação esquemática da via biossintética do ergosterol.....	21
Quadro 1	Principais proteínas relacionadas à virulência em dermatófitos.....	27
Figura 2	Representação da estrutura ungueal.....	34
Figura 3	Representação da estrutura química da griseofulvina.....	39
Figura 4	Representação da estrutura química do cetoconazol.....	40
Figura 5	Representação da estrutura química do itraconazol.....	40
Figura 6	Representação da estrutura química do fluconazol.....	41
Figura 7	Representação da estrutura química da terbinafina.....	41
Figura 8	Representação da estrutura química do ciclopirox olamina.....	43
Figura 9	Representação da estrutura química da amorolfina.....	43
Figura 10	Representação da estrutura química do efinaconazol.....	44
Figura 11	Representação da estrutura química de tavaborol.....	45
Quadro 2	Preços máximos ao consumidor de medicamentos para o tratamento das onicomicoses.....	46
Quadro 3	Mecanismos de ação, resistência e genes relacionados à resistência de fármacos antidermatofíticos.....	49
Figura 12	Reação de obtenção do ácido cinâmico.....	55
Figura 13	Representação esquemática da produção de fenilpropanoides a partir da glicose.....	58
Figura 14	Representação esquemática de compostos intermediários na síntese do ácido cinâmico.....	59
Figura 15	Síntese de cinamaldeído e eugenol a partir da fenilalanina.....	60
Figura 16	Estrutura química do $\alpha$ -metil- <i>trans</i> -cinamaldeído.....	61
Quadro 4	Resumo dos requisitos para o ensaio definitivo de toxicidade aguda com <i>Danio rerio</i> .....	68
Quadro 5	Resumo dos requisitos para o ensaio de toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i> .....	69
Tabela 1	Classificação da toxicidade aguda para organismos aquáticos	83
Tabela 2	Ensaio preliminar com os compostos e associações frente às linhagens de fungos filamentosos.....	85

Tabela 3	Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) dos fármacos de referência.....	87
Tabela 4	Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) de cinamaldeído, eugenol e $\alpha$ -metil- <i>trans</i> -cinamaldeído.....	88
Tabela 5	Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) de associações cinamaldeído/eugenol.....	89
Tabela 6	Índice de concentração inibitória fracional (CIF) para as associações cinamaldeído/eugenol.....	91
Figura 17	Eletromicrografia de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 11481 e <i>M. gypseum</i> ATCC 14683.....	93
Figura 18	Eletromicrografia de <i>Microsporum canis</i> ATCC 32903 e <i>Trichophyton rubrum</i> URM 1666.....	94
Figura 19	Eletromicrografia de <i>Fusarium oxysporum</i> ATCC 48112, <i>Fusarium solani</i> ATCC 36031 e <i>Epidermophyton floccosum</i> CCF-IOC-3757.....	95
Figura 20	Eletromicrografia de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	96
Tabela 7	Avaliação da presença de lipídios neutros, com o marcador BODIPY 493/503.....	99
Gráfico 1	Histograma ilustrando a porcentagem de células marcadas com MitoTracker Red CMXRos.....	99
Tabela 8	Resultados utilizando o marcador MitoTracker Red CMXRos..	100
Gráfico 2	Percentual de viabilidade celular em função da concentração de cinamaldeído.....	100
Figura 21	Aspecto da suspensão de cinamaldeído a 2 %.....	101
Tabela 9:	Atividade antifúngica da formulação.....	102

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	" ATP-binding cassette"
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Grau Célsius
$\pm$	Mais ou menos
%	Porcentagem
$\mu\text{g}$	micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\mu\text{mol}$	Micromol
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ADN	"Deoxyribonucleic acid" Ácido desoxirribonucleico
ARN	"Ribonucleic acid" Ácido ribonucleico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	"American Type Culture Collection" Coleção de cultura tipo americana
ATP	Trifosfato de adenosina
CEC	"Commision of the European Communities" Comissão das Comunidades Europeias
CENO	Concentração de efeito não obsevado
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo
CFM	Concentração fungicida mínima
CIF	Concentração inibitória fracional
CIM	Concentração inibitória mínima
CIM <sub>90</sub>	Concentração inibitória mínima de 90 % dos micro-organismos
CE <sub>50</sub>	Concentração efetiva mediana
CL <sub>50</sub>	Concentração letal mediana
CI <sub>50</sub>	concentração que inibe 50 %
CLSI	"Clinical and Laboratory Standards Institute" Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais
cm	Centímetro
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico

CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
CYP	"Cytochrome P 450" Citocromo P 450
CYP2	"Cytochrome P 450 2" Citocromo P 450 2
DMEM	meio <i>Eagle</i> modificado por Dulbecco
DL <sub>50</sub>	Dose letal média
DMSO	Dimetilsulfóxido
EUA	Estados Unidos da América
f. sp.	Formae speciales
FDA	"Food and Drug Administration" Administração de Alimentos e Drogas
g	Gramma
h	Hora
IBAMA	Instituto Brasileiro de Meio ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICMS	Imposto sobre circulação de mercadorias e prestação de serviços
ITS1	"Internal transcribed spacer 1" Espaço transcrito interno 1
kg	Kilograma
Kv	Kilovolts
L	Litro
M	Molar
mA/cm <sup>2</sup>	mili Amper/centímetro elevado ao quadrado
Mep3	Metaloprotease 3
Mep4	Metaloprotease 4
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mm	Milímetro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MOPS	3 (N-morfolino) propanosulfônico
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
n <sup>o</sup>	Número
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídio reduzido
nm	Nanômetro
NR	Não realizado

OECD	Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento
OsO <sub>4</sub>	Tetróxido de ósmio
PDR	"Pleiotropic drug resistance" Resistência pleiotrópica à droga
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Parte por milhão
p/v	Peso por volume
RPMI	"Roswell Park Memorial Institute" Instituto Memorial Parque Roswell
SDA	"Sabouraud dextrose agar" Ágar <i>Sabouraud</i> dextrose
SDB	"Sabouraud dextrose broth" Caldo <i>Sabouraud</i> dextrose
SE	Solução estoque
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
sp.	Espécie
spp.	Espécies
Sub3	Protease subtilisina 3
Sub5	Protease subtilisina 5
TDT	"Tellurite-resistance/dicarboxylate" Resistência à telurito/dicarboxilato
tRNA	"Transfer ribonucleic acid" Ácido ribonucleico de transferência
TrxA	Tiorredoxina
U/mL	Unidades por mililitro
UFC	Unidades formadoras de colônia
UI	Unidades Internacionais
USEPA	"United States Environmental Protection Agency" Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
v/v	Volume por volume

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Os fungos.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1.1 Fungos dermatófitos.....</b>	<b>23</b>
2.1.1.1 O complexo <i>Trichophyton mentagrophytes</i> .....	28
2.1.1.2 <i>Trichophyton rubrum</i> .....	29
2.1.1.3 <i>Microsporum canis</i> .....	29
2.1.1.4 <i>Microsporum gypseum</i> .....	30
2.1.1.5 <i>Epidermophyton floccosum</i> .....	30
<b>2.1.2 Fungos não dermatófitos.....</b>	<b>31</b>
2.1.2.1 <i>Candida albicans</i> .....	31
2.1.2.2 <i>Fusarium</i> .....	32
2.1.2.2.1 <i>Fusarium oxysporum</i> .....	32
2.1.2.2.2 <i>Fusarium solani</i> .....	33
<b>2.2 Anatomia da unha.....</b>	<b>34</b>
<b>2.3 Onicomicose.....</b>	<b>35</b>
<b>2.4 Terapias antifúngicas.....</b>	<b>37</b>
<b>2.4.1 Terapia farmacológica sistêmica.....</b>	<b>38</b>
2.4.1.1 Terapêutica com griseofulvina.....	38
2.4.1.2 Terapêutica com fármacos azólicos.....	39
2.4.1.3 Terapêutica com terbinafina.....	41
<b>2.4.2 Terapia farmacológica tópica.....</b>	<b>42</b>
2.4.2.1 Terapêutica tópica para onicomicoses leves.....	42
2.4.2.2 Terapêutica com ciclopirox olamina.....	42
2.4.2.3 Terapêutica com amorolfina.....	43
2.4.2.4 Terapêutica com efinaconazol.....	44
2.4.2.5 Terapêutica com tavaborol.....	45
<b>2.4.3 Avaliação do custo de terapias disponíveis no</b>	
<b>mercado.....</b>	<b>45</b>
<b>2.4.4 Resistência fúngica às terapias disponíveis.....</b>	<b>47</b>
<b>2.4.5 Novas alternativas terapêuticas.....</b>	<b>50</b>

2.4.6 Transporte de fármacos transungueal.....	50
2.5 Espécies vegetais como fonte de moléculas com propriedades medicinais e potencial antifúngico.....	51
2.6 Microscopia eletrônica.....	62
2.6.1 Microscopia eletrônica de varredura.....	62
2.6.2 Microscopia eletrônica de transmissão.....	63
2.7 Citometria de fluxo.....	64
2.8 Ensaios de toxicidade.....	65
2.9 Inovação.....	70
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>72</b>
3.1 Geral.....	72
3.2 Específicos.....	72
<b>4 MATERIAL e MÉTODOS.....</b>	<b>73</b>
4.1 Linhagens fúngicas de interesse.....	73
4.2 Compostos analisados.....	73
4.3 Avaliação da atividade antifúngica.....	73
4.3.1 Ensaio preliminar.....	73
4.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima.....	74
4.3.2.1 Fungos filamentosos dermatófitos.....	74
4.3.2.2 Fungos filamentosos não dermatófitos.....	76
4.3.2.3 Leveduras.....	76
4.3.3 Classificação da associação de compostos quanto ao efeito	77
4.3.4 Microscopia eletrônica de varredura.....	78
4.3.4.1 Ensaio com fungos filamentosos.....	78
4.3.4.2 Ensaio com levedura.....	79
4.4 Avaliação da atividade de fosfolipase em <i>C. albicans</i> .....	80
4.5 Citometria de fluxo.....	81
4.6 Ensaios de toxicidade.....	81
4.6.1 Ensaio de verificação da viabilidade celular pelo método de MTT.....	81
4.6.2 Ensaio com <i>D. magna</i> .....	82
4.7 Ensaio com a formulação.....	83

<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>85</b>
<b>5.1 Avaliação da atividade antifúngica.....</b>	<b>85</b>
5.1.1 Ensaio preliminar.....	85
5.1.2 Determinação da concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima.....	86
5.1.3 Classificação da associação de compostos quanto ao efeito.....	91
5.1.4 Microscopia eletrônica de varredura.....	92
<b>5.2 Avaliação da atividade de fosfolipase em <i>C. albicans</i>.....</b>	<b>98</b>
<b>5.3 Citometria de fluxo.....</b>	<b>98</b>
5.3.1 Alterações na presença de lipídios neutros.....	98
5.3.2 Alterações na atividade mitocondrial.....	99
<b>5.4 Ensaios de toxicidade.....</b>	<b>100</b>
5.4.1 Ensaio pelo método de MTT.....	100
5.4.2 Ensaio com <i>D. magna</i> .....	101
<b>5.5 Ensaio com a formulação farmacêutica.....</b>	<b>101</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>103</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>118</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>120</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>145</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A onicomicose é uma infecção fúngica que acomete as unhas. Os fungos dermatófitos são responsáveis por cerca de 90 % dos casos dessa doença, a qual também pode ser provocada por leveduras e fungos não dermatófitos (MARTÍNEZ et al., 2013). A doença representa um problema de saúde pública mundial e tem incidência e prevalência estimadas em 2 % e 13 %, respectivamente (COLEMAN, FLECKMAN e HUANG, 2014). Mais que uma preocupação estética ou cosmética, essa infecção pode causar dor e desconforto, com impactos negativos na autoestima e bem estar do paciente, especialmente em idosos, diabéticos e imunocomprometidos. Além disso, outros membros da família podem ser infectados (LASENNA e TOSTI, 2015; LIM et al., 2014).

O tratamento de onicomicose é longo, de custo elevado (AZAMBUJA et al., 2014; GHANNOUM e ISHAM, 2014) e, não raro, ocorre falha terapêutica, reinfecção e recidiva. Os fármacos administrados por via oral são considerados mais eficazes, com taxa de cura completa entre 14 % e 38 %; mas podem estar associados a reações adversas graves, que limitam seu uso e, muitas vezes, prejudicam a adesão dos pacientes à terapia medicamentosa (LIM et al., 2014; SCHER, NAKAMURA e TAVAKKOL, 2014). O tratamento tópico é considerado mais seguro, no entanto, apresenta baixa eficácia clínica (5 a 12 %) devido à dificuldade do fármaco penetrar na unha (GHANNOUM e ISHAM, 2014).

A utilização indiscriminada dos antifúngicos propiciou o surgimento de linhagens multirresistentes (AGBULU, IWODI e ONEKUTU, 2015) aos tratamentos farmacológicos convencionais com destaque para fungos dermatófitos, não dermatófitos (BACKES, JURSIĆ e NEUMANN, 2015; BADALI et al., 2015; DEBOURGOGNE et al., 2011; GHELARDI et al., 2014; KHAN et al., 2015) e novos patógenos oportunistas isolados de pacientes imunocomprometidos (TILLOTSON e TILLOTSON, 2015) e tornou necessária a busca por novas opções terapêuticas, que agregassem eficácia e baixa toxicidade (LIM et al., 2014).

As plantas representam fonte importante de compostos com atividade biológica (FLAMBÓ, 2013), sendo que muitos são derivados do metabolismo secundário vegetal, como por exemplo, os compostos fenilpropanoides, os quais possuem propriedades antifúngicas descritas anteriormente (FREIESLEBEN e JÄGER, 2014).

Dentre estes compostos, os derivados do ácido cinâmico, cinamaldeído e eugenol, merecem destaque por apresentarem ação contra fungos filamentosos (KHAN et al., 2012; XING et al., 2014) e leveduras (SHREAZ et al., 2011; TAGUCHI et al., 2013; DE PAULA et al., 2014). O derivado sintético  $\alpha$ -metilado do cinamaldeído,  $\alpha$ -metil-*trans*-cinamaldeído, também pode representar um antifúngico promissor, uma vez que reúne a atividade do cinamaldeído ao aumento da lipofilicidade, com possível redução da toxicidade e o aumento da atividade farmacológica (SHREAZ et al., 2011; KHAN et al., 2012; XING et al., 2014).

Portanto, esse estudo tem por objetivo avaliar a atividade antifúngica do cinamaldeído, eugenol,  $\alpha$ -metil-*trans*-cinamaldeído frente a *Trichophyton mentagrophytes*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Microsporium canis*, *M. gypseum*, *T. rubrum*, *Epidermophyton floccosum* e *Candida albicans*, avaliar o potencial ecotoxicológico e citotóxico e desenvolver uma formulação inovadora a partir do composto ou associação mais eficaz, para uso tópico no tratamento da onicomicose.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

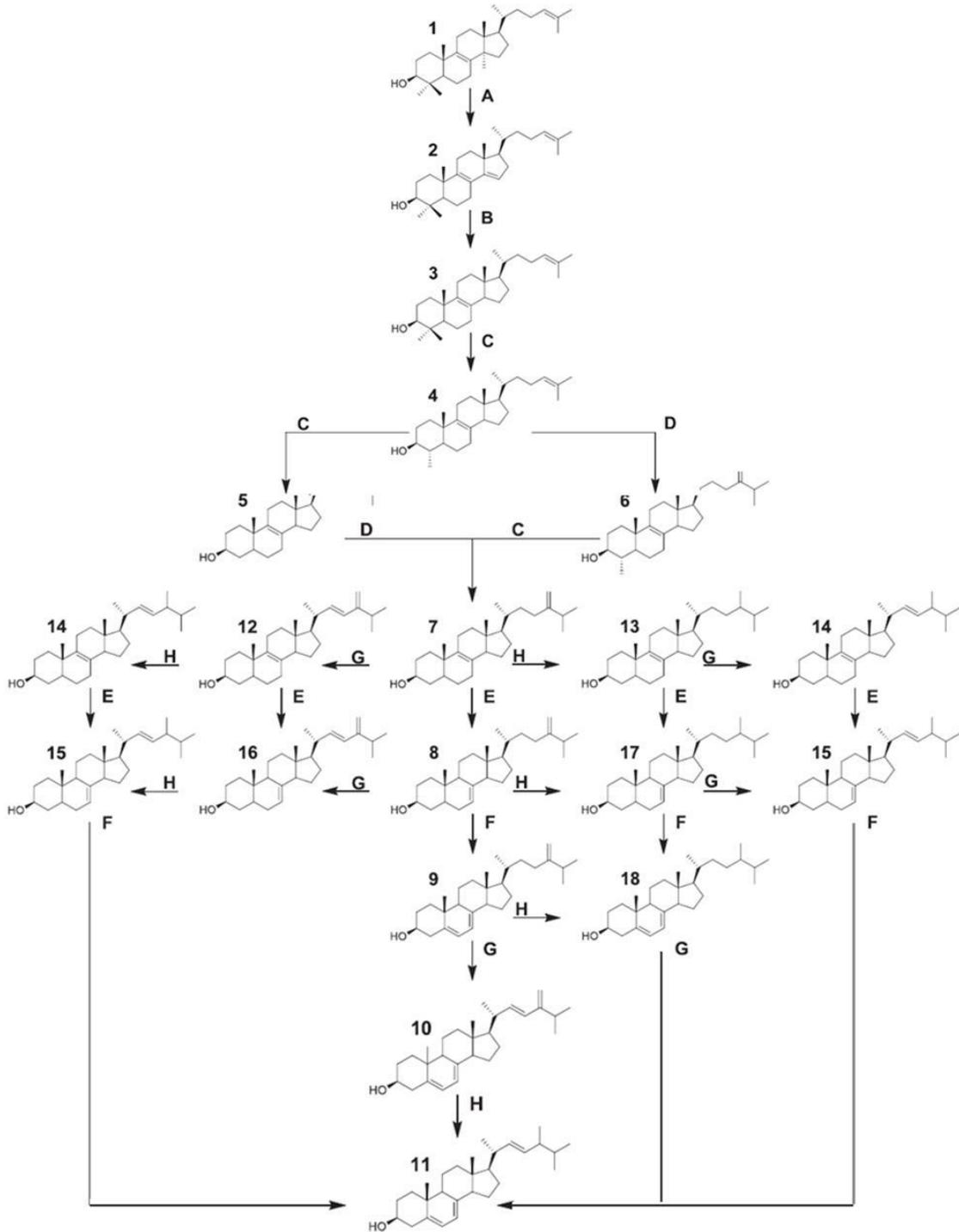
### 2.1 Os fungos

Os fungos são micro-organismos eucariontes, não fotossintéticos, pertencentes ao reino Fungi (GALIZA et al., 2014). Apresentam parede celular, a qual é importante na manutenção da forma e integridade da célula, bem como na proteção contra as injúrias do ambiente (ENE et al., 2015). A parede é composta por mais de 90 % de polissacarídeos, com um núcleo central  $\beta$ -1,3 glucano-quitina ramificado (LATGÉ, 2007). Também apresenta pigmentos, geralmente polifenólicos que, juntamente com os pigmentos presentes nos fluidos, vão conferir coloração às colônias (LOGUERCIO-LEITE et al., 2006). A composição da parede celular é um fator importante na patogenicidade, sendo possível estabelecer correlação direta entre as alterações químicas em sua composição e a virulência e dimorfismo celular (MARTINEZ-ROSSI, PERES e ROSSI, 2008).

A membrana plasmática fúngica é uma bicamada lipídica, que difere da bicamada animal pela presença do ergosterol, em substituição ao colesterol. Tal substância exerce papel importante na estrutura, na permeabilidade e na fluidez da membrana desses micro-organismos. O fato dos fungos apresentarem ergosterol na membrana plasmática é importante e constitui estratégia para a ação da maioria dos compostos antifúngicos (ALCAZAR-FUOLI e MELLADO, 2013; KAVANAGH, 2005). Müller e colaboradores (2013) informaram que os dois efeitos principais dos inibidores da biossíntese do ergosterol seriam as alterações na fluidez, na permeabilidade ou na função da membrana celular e o acúmulo de intermediários de biossíntese, que seriam tóxicos à célula fúngica.

De acordo com Alcazar-Fuoli e Mellado (2013), a biossíntese do ergosterol (Figura 1) é bem conhecida em *Saccharomyces cerevisiae*, servindo de modelo para o estudo em outros eucariontes. Tal biossíntese envolve cerca de 20 enzimas e a síntese de esqualeno a partir do mavalonato. No entanto, foi por meio da utilização de *Aspergillus fumigatus* que se alcançou a análise em nível genômico, incluindo a descoberta da participação de múltiplos genes na síntese de enzimas-chave como a esterol-14- $\alpha$ -demetilase e a esterol-C-5-desaturase.

Figura 1: Representação esquemática da via biossintética do ergosterol.



1: Lanosterol. 2: 4,4-dimetilcolesta-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol. 3: 4,4-dimetilzimosterol. 4: 4-metilzimosterol. 5: zimosterol. 6: 4-metilfecosterol. 7: fecosterol. 8: episterol. 9: 5-deidroepisterol. 10: 24(28)-deidroergosterol. 11: ergosterol. 12: ergosta-8,22,24(28)-trien-3 $\beta$ -ol. 13: ergosta-8-en-3 $\beta$ -ol. 14: ergosta-8,22-dien-3 $\beta$ -ol. 15: 5,6-diidroergosterol. 16: ergosta-7,22,24(28)-trien-3 $\beta$ -ol. 17: ergosta-7-en-3 $\beta$ -ol. 18: ergosta-5,7,dien- $\beta$ -ol. A: Esterol-14 $\alpha$ -demetilase. B: esterol- $\Delta$ 14-redutase. C: esterol-C4-demetilase. D: esterol-C24-metiltransferase. E: esterol- $\Delta^{8/17}$ -isomerase. F: esterol-C5-desaturase. G: esterol-C22-desaturase. H: esterol- $\Delta^{24(28)}$ -redutase.

Fonte: Adaptado de MÜLLER et al., 2013.

Além dessas estruturas, as células apresentam citoplasma com retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, mitocôndrias, vesículas secretórias, vacúolos, ribossomos e microfilamentos associados aos microtúbulos, como integrantes do citoesqueleto. O núcleo apresenta tamanho menor, se comparado às demais células eucarióticas (KAVANAGH, 2005; LACAZ et al., 2002).

Embora muitas espécies já tenham sido descritas, menos de 100 são associadas a doenças humanas. Esse reino é composto pelos grupos taxonômicos Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Microsporidia, Zygomycota e fungos anamórficos (KIRK et al., 2008).

A fase vegetativa se apresenta como duas unidades morfológicas, fungos filamentosos e leveduras. As leveduras são unicelulares, pequenas e delimitadas, enquanto as hifas formam tubos que se estendem continuamente em suas extremidades (KAVANAGH, 2005).

Em ambas as formas ou fases é possível perceber três matrizes interconectadas, que compreendem a matriz extracelular, parede celular e membrana plasmática. Em muitos fungos, a matriz extracelular é composta por substâncias mucilaginosas, com função na adesão e diversas enzimas. Também pode haver proteínas, as hidrofobinas, capazes de formar uma película anfipática, a qual tem importância no crescimento e diferenciação dos fungos, uma vez que protege o micélio (conjunto de hifas) aéreo. Além disso, estão presentes os cristais de oxalato de cálcio, os quais atuam no reforço da parede celular (LOGUERCIO-LEITE et al., 2006).

As colônias leveduriformes apresentam aspecto céreo brilhante, semelhante a bactérias (LOGUERCIO-LEITE et al., 2006). Em sua maioria, são glabras, com coloração branca ou bege. Microscopicamente, observam-se estruturas unicelulares, arredondadas ou ovaladas, que se reproduzem assexuadamente por brotamento ou formação de blastoconídios. A presença de hifas ou pseudo-hifas pode ser observada dentre as leveduras (MURRAY et al., 2004; SIDRIM e ROCHA, 2004).

Já as colônias de fungos filamentosos são compostas por um micélio que pode ser hialino ou demácio. Além disso, as hifas podem ser septadas ou asseptadas, sendo neste último caso também conhecido como micélio cenocítico (LOGUERCIO-LEITE et al., 2006). No entanto, esse critério de ausência de septação seja controverso, já que os fungos ditos asseptados apresentam septos espaçados e de difícil visualização em um campo microscópico (SIDRIM e ROCHA, 2004).

Macroscopicamente, as colônias podem ser caracterizadas pelos desenhos que apresentam nas bordas; pela textura, a qual pode ser algodonosa, furfurácea, penugenta, arenosa, veludosa ou glabrosa e pelo relevo ou a pigmentação que possuem. Além dessas características, para a diferenciação das espécies de fungos filamentosos são utilizadas as estruturas de frutificação ou estruturas de ornamentação (SIDRIM e ROCHA, 2004).

### 2.1.1 Fungos dermatófitos

Os dermatófitos são fungos capazes de invadir os tecidos queratinizados de humanos e de animais (PEREIRA, MENDES e LIMA, 2013), sendo, portanto, considerados queratinofílicos (REZENDE et al., 2008) e queratinolíticos (URIBE e CARDONA-CASTRO, 2013). Compreendem três gêneros anamórficos, assexuados ou imperfeitos: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* (GHANNOUM e ISHAM, 2014), que se assemelham em sua taxonomia (COSTA et al., 2002), limites de infectividade e de antigenicidade. Porém, esses micro-organismos se diferenciam quanto ao perfil enzimático e exigências nutricionais para o crescimento (PEREIRA, O., 2009). Os dermatófitos utilizam substratos de queratina como fonte de carbono, nitrogênio e enxofre (MARTINEZ-ROSSI, PERES e ROSSI, 2008). Sua fase perfeita, sexuada ou teleomórfica é classificada dentro do gênero *Arthroderma* (GIUDICE, 2008).

Também podem ser classificados quanto à origem em: antropofílicos e zoofílicos (REZENDE et al., 2008), os quais mantêm sua viabilidade por meio do parasitismo do homem e de animais, respectivamente, ou geofílicos, que permanecem viáveis em solos ricos em resíduos de queratina humana e/ou animal (URIBE e CARDONA-CASTRO, 2013). Os fungos zoofílicos tendem a provocar infecção aguda e são responsáveis por cerca de 30 % das dermatofitoses humanas, enquanto os antropofílicos, provocam infecção crônica, de progressão lenta e respondem por cerca de 70 % dos casos (PERES et al., 2010b).

Acredita-se que, evolutivamente, todos os dermatófitos tiveram origem a partir do solo, onde viviam como sapróbios. Ao adquirirem a capacidade de degradar a queratina presente nesses ambientes na forma de cabelos, pelos e descamação de pele de animais que conviviam no local, esses fungos passaram a parasitar esses animais, tornando-se zoofílicos. A adaptação ao parasitismo dessas espécies tornou

possível o desenvolvimento do parasitismo humano, com o aparecimento de fungos antropofílicos (PEREIRA, O., 2009).

Podem ser cosmopolitas ou sua distribuição pode estar relacionada a fatores como adaptação ao meio ambiente, movimentos populacionais, contato com animais domésticos. Também devem ser considerados os aspectos socioeconômicos, idade, sexo, competência do sistema imunológico do hospedeiro, o que faz com que seu espectro varie entre diferentes regiões geográficas (REZENDE et al., 2008).

As dermatofitoses ainda constituem um problema de saúde pública não apenas nos países tropicais, em função do clima úmido, alta densidade demográfica e condições precárias de higiene (NATARAJAN, VENUGOPAL e MENON, 2003), mas também em todo o mundo (PEREIRA, O., 2009). Esta importância em saúde pública se dá pelo fato de se caracterizarem como antropozoonoses (MADRID et al., 2012). Mundialmente, é preocupante o aumento da prevalência e incidência dessas infecções, bem como o aumento do uso de antifúngicos e consequente aparecimento de espécies resistentes aos tratamentos convencionais (NASERI et al., 2013; SOARES et al., 2013).

Em indivíduos imunocompetentes, esses fungos geralmente são incapazes de penetrar as camadas mais profundas da pele, fazendo com que a infecção fique restrita à camada córnea (SOARES et al., 2013). No entanto, em indivíduos imunocomprometidos pode haver a formação de granulomas (PERES et al., 2010b). Produzem enzimas como lipases, endopeptidases, glicosidases, nucleases, colagenases, elastases e queratinases, as quais são responsáveis pela digestão e metabolização de diversas estruturas teciduais (PEREIRA, O., 2009).

A severidade da infecção está relacionada ao agente etiológico e ao comprometimento imunológico do hospedeiro. A transmissão se dá por contato direto com seres humanos, animais ou solos contaminados ou por contato direto ou indireto com fômites contaminadas (PERES et al., 2010b).

Kavanagh (2005) informou que as dermatofitoses podem ser classificadas clinicamente conforme o sítio anatômico acometido, sendo o termo *tinea* utilizado para todas as dermatofitoses. Acrescenta-se, a esse termo, a localização da infecção, assim tem-se *tinea capitis* (cabeça), *tinea corporis* (corpo), *tinea cruris* (virilha), *tinea unguium* (unha), *tinea barbae* (barba), *tinea manuum* (mão) e *tinea pedis* (pé).

Em 2005 e 2008, respectivamente, Martelozo, Guilhermetti e Svidzinski e Rezende e colaboradores citaram que os fungos dermatofíticos constituíam-se no grupo fúngico mais frequentemente isolado nos laboratórios. A infecção provocada por estes micro-organismos acometia entre 20 e 25 % da população (NASERI et al., 2013). Dentre as doenças que acometem as unhas, as onicomicoses dermatofíticas representavam de 18 % a 40 % (ARAÚJO et al., 2003; PEREIRA, O., 2009). A prevalência das onicomicoses é maior em idosos e o aumento da prevalência destas onicopatias é o fator pelo qual se atribui importância a essa doença (ARAÚJO et al., 2003; PERES et al., 2010b). Adams e colaboradores (2015) atribuíram o maior número de casos entre os idosos a diversas causas, dentre as quais estão a redução da circulação sanguínea, a imunidade, a presença de comorbidades como o diabetes, as irregularidades da superfície ou as injúrias sofridas nas unhas.

O aumento do número dessas infecções tem ocorrido, dentre outras causas, pela epidemia de síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), uso de imunossupressores em transplantados, uso indiscriminado de corticoides e antibióticos, atividades físicas comunitárias ou em academias de ginástica. Este tipo de infecção deve ser considerada, dado que a qualidade de vida do paciente é reduzida, assim como sua autoestima (ARAÚJO et al., 2003; MARTELOZO, GUILHERMETTI e SVIDZINSKI, 2005). Algumas vezes, a capacidade funcional da porção anatômica acometida pode ser afetada. Além disso, em pacientes com comorbidades como diabetes *mellitus* podem ocorrer até mesmo amputações (ARAÚJO et al., 2003; FLORES, BECK e SILVA, 2016).

Martelozo, Guilhermetti e Svidzinski (2005) atentaram para o fato de que o aumento da prevalência das onicomicoses pode estar relacionado a fatores como a modernização dos serviços de saúde, com a inclusão de exames laboratoriais confirmatórios. Aliado a isso, tem-se a capacitação dos recursos laboratoriais e, sobretudo, pelo aumento da demanda, devido a mudanças de hábitos impostos pela vida moderna, com maior busca por solução dos problemas de saúde. Enquanto Naseri e colaboradores (2013) citaram que a disseminação pode estar relacionada ao movimento de militares, migração de trabalhadores, processo imigratório, hábitos sociais e viagens rápidas pelo mundo.

Os fungos dermatófitos são considerados os principais agentes causadores de onicomicoses, seguidos por leveduras e por fungos não dermatofíticos. O diagnóstico micológico pode ser baseado no exame direto, identificação do agente

etiológico, mediante cultivo e/ou com a utilização de provas bioquímicas (ARAÚJO et al., 2003).

A infectividade desses fungos e a colonização do hospedeiro dependem, principalmente, da forma como conseguem escapar aos mecanismos de defesa do organismo. Dentre esses mecanismos, é possível citar a baixa hidratação de alguns sítios; pH ligeiramente ácido da pele; processo de queratinização, que tende a remover as estruturas fúngicas. Além de atividade fungicida dos ácidos graxos, exposição à luz ultravioleta e a competição com a microbiota residente (PERES et al., 2010b; SOARES et al., 2013).

Soares e colaboradores (2013) ressaltaram que a infecção tem início com a deposição de artroconídios no sítio e esse processo é favorecido por lesões pré-existentes e a atividade queratinolítica do fungo. A germinação do conídio deve ser rápida e as hifas devem penetrar nas estruturas queratinizadas. Após a adesão, são necessários nutrientes para o desenvolvimento do micro-organismo. Para isso, inicia-se a síntese de proteases, lipases, elastases, colagenases, fosfatases e esterases, capazes de metabolizar as moléculas presentes no tecido do hospedeiro. Essas enzimas são consideradas fatores importantes de virulência, sendo possível estabelecer uma relação direta entre a atividade queratinolítica e a patogenicidade do fungo (MARTINEZ-ROSSI, PERES e ROSSI, 2008; PERES et al., 2010b).

A capacidade de aderência fúngica, relacionada à virulência, foi atribuída a glicoproteínas da parede celular, contendo mananas. É importante ressaltar que essas mananas reduzem a resposta imune do hospedeiro e a fagocitose e, conseqüentemente, a remoção do fungo (MARTINEZ-ROSSI, PERES e ROSSI, 2008; PERES et al., 2010b).

Em *T. rubrum*, sugere-se que a redução das pontes de dissulfeto da cisteína presente na queratina seja dependente de uma bomba de efluxo de sulfeto, a qual é codificada pelo gene *TruSsu1*, da família dos transportadores TDT (*tellurite-resistance/dicarboxylate*). Com a secreção do sulfeto, a cisteína é clivada e se torna disponível à ação das proteases. Ainda nessa espécie, verificou-se que a hidrólise da queratina é regulada pelo gene *pacC*, o qual interfere na produção de proteases ativas em meio alcalino (PERES et al., 2010b).

Já a severidade da infecção está relacionada à imunidade do hospedeiro, virulência da espécie envolvida, sítio acometido, fatores ambientais e a reação do hospedeiro a metabólitos produzidos pelos fungos (MARTINEZ-ROSSI, PERES e

ROSSI, 2008; SOARES et al., 2013). Muitas enzimas são importantes na patogênese fúngica, Peres e colaboradores (2010b) informaram que as espécies *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis* e *E. floccosum* apresentam atividade lipolítica, secretando lipases e fosfolipases. O Quadro 1 apresenta algumas enzimas e suas funções na célula fúngica e/ou processo infeccioso.

Quadro 1: Principais proteínas relacionadas à virulência em dermatófitos.

Gene/Proteína	Função
Isocitrato liase	Participa do ciclo do glioxilato
Malato sintase	Participa do ciclo do glioxilato
Citrato sintase	Participa do ciclo do glioxilato
Fosfolipase B	Relacionada ao mecanismo de virulência de <i>C. albicans</i>
Protease subtilisina (Sub3)	É a principal enzima proteolítica secretada por <i>T. rubrum</i> durante o processo infeccioso
Protease subtilisina (Sub5)	Relacionada ao mecanismo de virulência
Metaloprotease (Mep3)	Produzida por <i>M. canis</i> durante a infecção em porcos da Guiné
Metaloprotease (Mep4)	Considerada a principal metaloprotease secretada por <i>T. rubrum</i> durante o processo infeccioso
Carboxipeptidase	Participa da captação de nutrientes durante a infecção
Dipeptidil-peptidase V	Fator de virulência em <i>M. canis</i> , participando da captação de nutrientes durante a infecção
Transportador ABC (ATP-binding cassette) TruMDR1	Relacionado à resistência de <i>T. rubrum</i>
Transportador ABC TruMDR2	Relacionado à virulência de <i>T. rubrum in vitro</i>
Manosiltransferase	Relacionada à virulência de <i>C. albicans</i>
Glucosamina 6-fosfato desaminase	Relacionada à virulência de <i>C. albicans</i> em modelo murino
Fator de transcrição PacC	Relacionado à virulência de <i>T. rubrum in vitro</i>
Tiorredoxina TrxA	Provável fator de virulência em <i>T. mentagrophytes</i>

Fonte: PERES et al., 2010a.

Em relação à fosfolipase, é importante salientar que a secreção dessa enzima é prevalente em fungos patogênicos e está diretamente relacionada à patogenicidade fúngica. O aumento da virulência ocasionado pelas fosfolipases decorre, principalmente, do dano à membrana do hospedeiro, que possibilita a

penetração do micro-organismo e também pela liberação de metabólitos de fosfolípidos, capazes de servirem como nutrientes ao fungo (BISHOP et al., 2013).

#### 2.1.1.1 O complexo *Trichophyton mentagrophytes*

*Trichophyton mentagrophytes* pertence a um complexo com fase teleomórfica (LACAZ et al., 2002), ao qual se incluem espécies antropofílicas e zoofílicas, dentre as quais se pode destacar *A. vanbreuseghemii*, *A. simii* e *A. benhamiae* (DROUOT et al., 2008; MAKIMURA et al., 1998). A primeira espécie inclui fungos zoofílicos e antropofílicos e Drouot e colaboradores (2008) destacaram que foi isolada de humanos, ratos e chinchilas. *A. benhamiae* foi isolada de roedores e pode acometer crianças e jovens, que tenham contato com esses animais e provocar um processo altamente inflamatório. A fase sexuada é capaz de produzir órgãos sexuais ou esporos oriundos de partenogênese. A fase assexuada, imperfeita ou anamorfa é chamada de *Trichophyton mentagrophytes* (LACAZ et al., 2002).

Makimura e colaboradores (1998) utilizaram o sequenciamento de DNA ribossomal do primeiro espaço transcrito interno (ITS1, do inglês *internal transcribed spacer 1*) e estabeleceram relações filogenéticas mútuas entre as espécies que compõem o complexo. Os autores classificaram as 37 espécies e os isolados clínicos dentro de três grupos ITS1 homólogos (I, II e III) e treze grupos ITS1 idênticos por sua sequência genética. Em ITS1 I se incluíram fungos da espécie *A. vanbreuseghemii*; ao grupo II, a espécie *A. simii* e, ao grupo III, a espécie *A. benhamiae*, que, posteriormente, foi classificada como raça.

A espécie *A. vanbreuseghemii* é filogeneticamente relacionada aos anamorfos *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* e var. *granulosum*; enquanto *A. benhamiae* relaciona-se à *T. mentagrophytes* var. *erinacei* e *A. simii* à *T. mentagrophytes* var. *quinckeanum* (ZIÓLKOWSKA et al., 2015).

Segundo Drouot e colaboradores (2008), as colônias desse complexo apresentam cores e texturas variadas, que pode ser avermelhada, branca ou de amarelo a marrom. O micélio é geralmente aveludado e apresenta poucas dobras. Para esses autores, o anamorfo (indivíduo com reprodução assexuada) zoofílico relacionado à *A. vanbreuseghemii* deve ser chamado de *T. mentagrophytes* variante *asteroides*; enquanto o anamorfo antropofílico seria *T. mentagrophytes* variante *interdigitale*.

### 2.1.1.2 *Trichophyton rubrum*

*Trichophyton rubrum* é uma espécie considerada antropofílica e mais frequente dentre os dermatófitos. Esse fungo provoca, principalmente, lesões na pele e nas unhas (GHELARDI et al., 2014). Sua transmissão é inter-humana ou por meio de fômites contaminados (SIDRIM e ROCHA, 2004). Segundo Pereira, O. (2009), as infecções por esse fungo tendem a ser persistentes e recorrentes em cerca de 70 % dos pacientes. Sidrim e Rocha (2004) atribuíram esse fato a sua adaptação ao hospedeiro humano, com capacidade de escapar das defesas do organismo, permanecendo como infecção residual.

As colônias apresentam crescimento entre 7 a 14 dias, segundo Rodrigues (2007). Exibem coloração branca, de aspecto cotonoso, passando a aveludado. O reverso da colônia apresenta pigmentação avermelhada púrpura (RODRIGUES, 2007), mas podem ser observadas diferentes tonalidades de castanho (SIDRIM e ROCHA, 2004). As colônias apresentam pregas radiais, formando uma saliência ao centro (PEREIRA, O., 2009). Microscopicamente, apresentam hifas septadas hialinas, microconídios em forma de lágrima ou gotas, dispostos ao longo das hifas ou em cachos e raros macroconídios (PEREIRA, O., 2009; RODRIGUES, 2007).

Não é capaz de perfurar o pelo no teste *in vitro* de perfuração de pelo ou hidrolisar a ureia, no teste da urease no meio *Christensen*. Estes testes o diferenciam de *T. mentagrophytes* (PEREIRA, O., 2009).

### 2.1.1.3 *Microsporum canis*

O anamorfo *Microsporum canis* é uma espécie zoofílica (MARTÍNEZ et al., 2013), ou seja, capaz de manter sua viabilidade com o parasitismo em animais. É considerado o principal responsável pelas dermatofitoses zoofílicas em humanos (CHAVES, 2007). A fase sexuada é representada pela espécie *A. otae* (MIHALI et al., 2012).

Os animais domésticos, cães e gatos, são reservatórios desses fungos e a infecção humana se dá pela exposição a hifas ou arthroconídios presentes em pelos aparentemente saudáveis (SOARES et al., 2013). Os felinos jovens são considerados os principais reservatórios dessa espécie (SIDRIM e ROCHA, 2004).

As colônias apresentam aspecto macio, depressão central, dobras radiais com verso amarelo-alaranjado (MIHALI et al., 2012). Sidrim e Rocha (2004) consideraram o fato de possível pleomorfismo, com colônias algodonosas e brancas, constituídas por hifas estéreis e o reverso com coloração variando de alaranjado a marrom, sem pigmento difusível no meio. Microscopicamente, observam-se macroconídios fusiformes septados e de paredes grossas (CHAVES, 2007). Também podem ser observados microconídios, clamidoconídios, órgãos nodulares e hifas pectinadas (SIDRIM e ROCHA, 2004).

#### **2.1.1.4 *Microsporum gypseum***

Considerado um dermatófito geofílico, o anamorfo *M. gypseum* foi isolado pela primeira vez em 1894 (MONTEIRO et al., 2003). É capaz de acometer o homem e os animais e a fonte de contaminação é o solo, principalmente os ricos em resíduos de queratina humana ou animal como os jardins, nos quais os animais costumam cavar (CHAVES, 2007).

Nos estudos de Giudice e colaboradores (2012), os autores verificaram, com o emprego de biologia molecular, a existência de duas espécies teleomórficas, *A. gypseum* e *A. incurvatum*. Mas Hubka e colaboradores (2014) citaram também as espécies *M. fulvum*, *M. persicolor*, *M. nanum*, *M. praecox*, *M. duboisii* e *M. aenigmaticum*.

As colônias com superfície plana, bordas irregulares e textura arenosa, de coloração variando de amarelo a acastanhado, crescem entre 3 e 5 dias. Apresentam hifas hialinas, septadas e ramificadas (MACÊDO, NEVES e LOPES, 2008). Os macroconídios são septados, simétricos, apresentam paredes finas, extremidades arredondadas e superfície com rugosidades (CHAVES, 2007). Diferem do *M. canis* pela parede fina dos macroconídios e extremidade menos pontiaguda (SIDRIM e ROCHA, 2004).

#### **2.1.1.5 *Epidermophyton floccosum***

Trata-se de um fungo dermatófito antropofílico (LACAZ et al., 2002), com distribuição universal e relacionada à exposição em locais públicos como academias de ginástica ou uso de chuveiros coletivos (AQUINO, CONSTANTE e BAKOS,

2007). A temperatura de crescimento e a atividade de enzimas como a proteinase e fosfolipase podem ser importantes fatores na patogênese fúngica (MACÊDO et al., 2005).

Apresentam macroconídios na extremidade de conidióforos, bi ou trisseptados, com paredes lisas e espessas. Não apresentam microconídios (MORAES, PAES e HOLANDA, 2009). As colônias crescem entre 7 e 10 dias e apresentam textura cotonosa baixa, relevo umbilicado e evolução para pulverulenta na região intermediária. As bordas do verso da colônia podem apresentar coloração amarelo-esverdeada ou castanho-amarelada (COSTA, 2008).

## 2.1.2 Fungos não dermatófitos

### 2.1.2.1 *Candida albicans*

As leveduras do gênero *Candida* são fungos considerados oportunistas e são responsáveis pela infecção conhecida como candidíase (LIM et al., 2012), caracterizada como a infecção fúngica mais comum. Dentro desse gênero, *C. albicans* é o principal agente etiológico (LIMA et al., 2006). Apresentam colônias de textura cremosa, de coloração e odor característicos. Microscopicamente, formam blastoconídios esféricos ou levemente ovais (PETERS et al., 2014) e podem apresentar pseudo-hifas, como referido por Murray e colaboradores (2004). Lim e colaboradores (2012) consideraram essa espécie como polimórfica, sendo, juntamente à espécie *C. dubliniensis*, os únicos micro-organismos dentro desse gênero capazes de formar pseudo-hifas.

*C. albicans* é um fungo comensal, que integra a microbiota das regiões mucocutânea, genitourinária e gastrintestinal humana (LIM et al., 2012). Para Peters e colaboradores (2014), a transição entre as formas de hifa e leveduriforme é considerada o maior fator de virulência desse micro-organismo.

Existem casos descritos na literatura de resistência dessas leveduras aos azólicos, terapia convencional nas onicomicoses, em pacientes expostos de forma prolongada a essas substâncias (LIMA et al., 2006; LIMA et al., 2009; KHAN et al., 2015).

### 2.1.2.2 *Fusarium*

Esse gênero tem ampla distribuição geográfica, sendo considerado um importante componente da microflora em todo o mundo. Pode sobreviver em diversos *habitats*, abrigando-se em solos naturais ou cultivados, nos quais podem permanecer por longo tempo como saprófitas (POLETTTO et al., 2006). Para Ethur e colaboradores (2007), *F. oxysporum* e *F. solani* são fitopatógenos habitantes do solo, cosmopolitas e que provocam danos econômicos ao setor agrícola.

Conforme Pinto (2008), este é um morfo-gênero, que corresponde a um grupo de fungos que compartilham determinadas características morfológicas, como formação de macroconídios em esporodóquio, microconídios em fiálides e, em situações desfavoráveis, produzem clamidósporos. No entanto, Fourie e colaboradores (2011) afirmaram que a identificação das espécies desse gênero pode se tornar um desafio. Isso se deve a variações dos isolados, que refletem a genética e a influência das condições ambientais na expressão fenotípica dos caracteres.

São considerados fungos contaminantes e saprófitas, além de agentes de micoses oportunistas e têm se destacado como um dos causadores de onicomicoses (MARTELOZO, GUILHERMETTI e SVIDZINSK, 2005). No entanto, são geralmente resistentes à maioria dos antifúngicos disponíveis comercialmente para o tratamento dessas patologias, com destaque para fluconazol e itraconazol e respondem de forma variada a voriconazol e posaconazol (DELARZE e SANGLARD, 2015; GHANNOUM e ISHAM, 2014; SALAS-CAMPOS, GROSS-MARTÍNEZ e CARRILO-DOVER, 2007).

#### 2.1.2.2.1 *Fusarium oxysporum*

*Fusarium oxysporum* constitui uma espécie-complexo composta por dezenas de espécies (SOUZA, 2009), que podem ser divididas em *formae speciales* (f. sp.); as quais, podem compreender várias linhas clonais, que correspondem a grupos de compatibilidade vegetativa (MICHIELSE e REP, 2009). São fungos de reprodução assexuada ou sexuada e inclui patógenos humanos e animais, além de não patógenos (FOURIE et al., 2011; MICHIELSE e REP, 2009). A diferenciação entre

essas várias espécies pode ser realizada por testes de patogenicidade, mas não por características morfológicas ou reprodutivas (FOURIE et al., 2011).

*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* apresenta hifas septadas, com colônias pouco coloridas inicialmente, que tendem a se tornar amarelo-pálidas e, sob determinadas condições, adquirem coloração rosa - pálida ou púrpura. Estudos realizados em tomateiro mostraram que essa forma é capaz de produzir uma toxina, conhecida como ácido fusálico, que aumenta a permeabilidade da membrana do hospedeiro, com perda de eletrólitos pela célula (SOUZA, 2009).

Segundo Pio, Fraga e Macêdo (2008), a espécie *Fusarium oxysporum* produz três tipos de esporos, chamados microconídios, macroconídios e clamidósporos, sendo os microconídios os mais frequentemente produzidos por este fungo. Os macroconídios possuem formato de fuso, ligeiramente curvos e com 3 a 5 septos (SOUZA, 2007). Os microconídios são elípticos e os clamidósporos são hialinos, intercalares às hifas, macroconídios ou ainda terminais. Esse terceiro tipo de esporo, considerado de resistência, resulta da transformação das hifas e pode se manter viável no solo durante anos, mesmo na ausência de hospedeiro. Uma das características que o difere de *F. solani* é que as células conidiogênicas, das quais emergem os conídios, são fiáides curtas (PEREIRA, 2007; SOUZA, 2009). Macroscopicamente, as colônias de *F. oxysporum* apresentam textura flocosa, com pigmentação pálida de creme a violeta ou púrpura (ASCENÇÃO e FILHO, 2013).

#### 2.1.2.2.2 *Fusarium solani*

Esta espécie pode causar impacto econômico devido aos danos à agricultura. Além disso, esse fungo tem distribuição cosmopolita e sementes contaminadas podem levá-lo para outras regiões produtoras, o que é importante e requer medidas de controle (VENTUROSOSO et al., 2010).

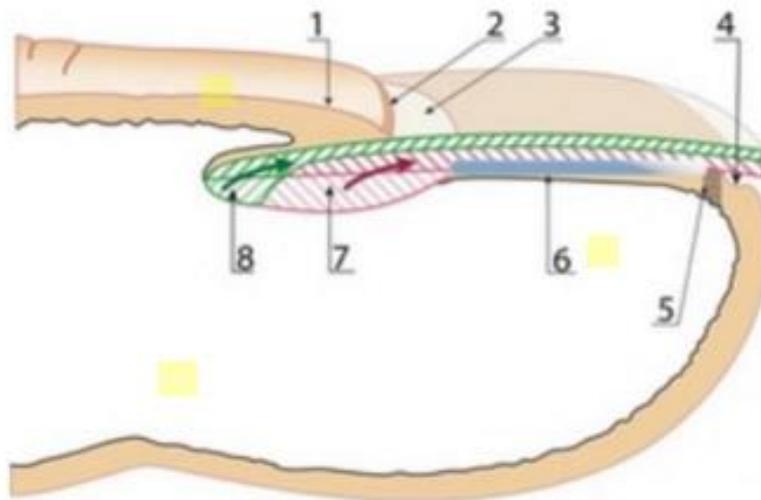
Aleixo (2003) afirmou que *F. solani* f. sp. *glycines*, principalmente quando cultivado por longos períodos, possui massas de esporos de pigmentação rosa ou violeta. No entanto, Souza (2007) descreveu as colônias como flocosas, de rápido crescimento e com coloração variando do cinza ao marrom azulado, com micélio exuberante. Morfologicamente, assemelha-se à *F. oxysporum*, porém apresenta conidióforo mais longo, clamidósporos geralmente aos pares ou isolados na extremidade do conidióforo, intercalado às hifas ou em macroconídios em forma de

fuso ou dispersos no meio de cultura. Esses macroconídios possuem de 1 a 8 septos.

## 2.2 Anatomia da unha

A unha é uma estrutura córnea, semirrígida, que se forma a partir da nona semana embrionária e recobre o dorso das pontas dos dedos, sendo importante para a discriminação tátil e manipulação de pequenos objetos. Trata-se de um derivado ectodérmico, constituído por quatro epitélios especializados, a matriz, o leito ungueal, a prega ou dobra ungueal proximal e o hiponíquium (GOMES, LENCASTRE e LOPES, 2012). A estrutura ungueal pode ser visualizada na Figura 2 a seguir:

Figura 2: Representação da estrutura ungueal.



1: Dobra proximal. 2: cutícula. 3: lúnula. 4: hiponíquio – sulco ungueal distal. 5: região de alta aderência ao leito – corresponde à faixa onicodérmica. 6: leito ungueal. 7: matriz distal (produz a placa ungueal). 8: matriz proximal (produz o dorso da placa ungueal).

Fonte: Adaptado de BARAN e NAKAMURA, 2011.

A matriz estende-se 6 mm abaixo da dobra proximal e em sua porção proximal encontra-se a lúnula, uma estrutura opaca, esbranquiçada e em forma de semicírculo, que é mais proeminente no polegar. É responsável pela produção de células que irão constituir a placa ungueal. O leito estende-se da lúnula ao hiponíquio e apresenta-se como cristas longitudinais, consiste da pele abaixo da

placa ungueal. A dobra ungueal (eponíquio) está aderida à placa ungueal e sofre descamações, formando a cutícula. O hiponíquio, por sua vez, constitui uma extensão da epiderme volar, abaixo da placa ungueal e marca o ponto em que essa placa separa-se do tecido subjacente (BARAN e NAKAMURA, 2011; KUMAR e RAJU, 2013).

De acordo com Gomes, Lencastre e Lopes (2012), a proliferação celular da matriz produz camadas múltiplas de células corneificadas que cobrem o leito, constituindo o prato ou placa ungueal. Essa placa ungueal está inserida proximal e lateralmente nas dobras ungueais e adquire coloração rosada em função dos capilares presentes no leito ungueal. A borda distal do prato ungueal é livre e esbranquiçada, devido o contato com o ar. As unhas das mãos crescem, em média, 0,1 mm ao dia; enquanto as unhas dos pés crescem 1 mm ao mês. No entanto, condições como desnutrição ou doença grave podem reduzir ou parar esse crescimento (GOMES, LENCASTRE e LOPES, 2012).

A placa ungueal é composta, em sua maioria, por  $\alpha$ -queratina rica e enxofre e por pequena porcentagem de lipídios. Constitui uma estrutura rígida e impermeável devido às ligações de hidrogênio e dissulfeto entre as moléculas de queratina e representa a barreira mais resistente do corpo humano (CHOUHAN e SAINI, 2012).

### **2.3 Onicomicose**

A onicomicose é uma infecção fúngica da lâmina ungueal e tecidos circundantes. É responsável por até 50 % das lesões ungueais, com prevalência de, aproximadamente, 3 % em adultos até 55 anos, podendo alcançar 18,2 % entre os idosos. Essa infecção pode acometer tanto homens, quanto mulheres, na proporção de 3 indivíduos do sexo masculino para cada mulher acometida (DELL ROSSO, 2014; GHANNOUM e ISHAM, 2014; SCHECHTMAN, 2011). Em relação ao maior acometimento de homens, Peres e colaboradores (2010b) atentaram para o fato de que esteroides, como a progesterona, poderiam inibir o crescimento de fungos antropofílicos, com efeito dose-dependente. Isso porque proteínas do citosol do micro-organismo poderiam ligar-se, especificamente, ao hormônio, ocasionando o efeito antidermatofítico.

Pode ser classificada em 5 tipos, de acordo com a extensão do comprometimento e a porção envolvida (SCHECHTMAN, 2011; SHEMER et al., 2015):

- a) onicomicose subungueal distal e lateral;
- b) onicomicose superficial;
- c) onicomicose subungueal proximal;
- d) onicomicose do tipo endonyx;
- e) onicomicose com distrofia total.

A onicomicose é a micose superficial mais frequentes e de mais difícil diagnóstico e tratamento, devido a fatores intrínsecos da unha (GHANNOUM e ISHAM, 2014; SALAS-CAMPOS, GROSS-MARTÍNEZ e CARRILO-DOVER, 2009). Pode ser causada por fungos dermatófitos e, menos frequentemente, por fungos não dermatófitos como *Candida* spp., *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Scopulariopsis* spp., *Scytalidium* spp. e outros (DELL-ROSSO, 2014). Martínez e colaboradores (2013) destacaram que as principais espécies envolvidas no acometimento das unhas dos pés são *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *E. floccosum*, enquanto as leveduras do gênero *Candida* são as principais responsáveis pela infecção das unhas das mãos.

Essas infecções têm natureza multifatorial e demandam tratamento farmacológico, já que não se curam espontaneamente. Não raro, este tratamento é prolongado e sem resposta terapêutica (GHANNOUM e ISHAM, 2014; LIMA et al., 2009). Quando não é realizado o tratamento, pode evoluir para deformidade e destruição das unhas (DELL ROSSO, 2014). É necessário ressaltar que a onicomicose por fungos filamentosos não dermatofíticos é resistente à maioria das terapias antifúngicas disponíveis (SCHECHTMAN, 2011).

Ghannoum e Isham (2014) informaram que além de a idade, o comprometimento imunológico e a ocorrência de trauma nas unhas constituírem fatores predisponente ao desenvolvimento da onicomicose, o fator genético também pode constituir fator de risco, uma vez que em um estudo raro, a dermatofitose profunda em indivíduos com depleção do autossoma recessivo CARD9 foi fatal.

Embora esta doença não coloque em risco a vida do paciente imunocomprometido, ela pode acarretar desconforto (MARTÍNEZ et al., 2013), como dor ao caminhar ou dificuldade para cortar as unhas (GHANNOUM, ISHAM e CATALANO, 2014). Os pacientes diabéticos com onicomicose apresentam três

vezes mais chances de desenvolverem úlceras e gangrena nos pés em relação aos diabéticos não acometidos pela infecção fúngica (LASENNA e TOSTI, 2015). Além disso, tem impacto negativo na qualidade de vida do portador, não só pelo desconforto, mas por se constituir em um problema estético (SALAS-CAMPOS, GROSS-MARTÍNEZ e CARRILLO-DOVER, 2007), podendo alterar as condições de trabalho, quando afetam as unhas das mãos (NEGRONI, 2008) ou ainda ser transmitida a outros membros da família (DELL ROSSO, 2014).

Scher e colaboradores (2007), Ghannoum e Isham (2014) e Ghannoum, Isham e Catalano (2014) consideraram, como critério de cura da onicomicose, as curas clínica (aparência normal da unha) e micológica (exames micológico direto e cultura negativos).

## **2.4 Terapias antifúngicas**

A definição da terapia antifúngica adequada deve considerar o micro-organismo envolvido, o sítio acometido e o estado imunológico do paciente. Por se tratar de células eucariontes, existe a dificuldade de se desenvolver antifúngicos específicos e que não sejam tóxicos às células dos hospedeiros (MURRAY et al., 2004).

De acordo com Martelozo, Guilhermetti e Svidzinski (2005), um dado importante tem sido as mudanças quanto à etiologia das onicomicoses. Assim, a adequada determinação do agente etiológico, com a confirmação laboratorial, norteia o estabelecimento da terapêutica correta e eficaz, uma vez que diferentes micro-organismos respondem de forma diferenciada aos antifúngicos.

Fatores como a queratina muito densa, a pouca vascularização, que dificulta a penetração da medicação sistêmica ou crescimento lento das unhas tornam o tratamento das onicomicoses difícil e prolongado (BHATT e PILLAI, 2015; DELL ROSSO, 2014).

Gupta e Paquet (2013) citaram cinco estratégias que têm sido adotadas para melhorar os resultados no tratamento das onicomicoses, a curto e em longo prazo, as quais seriam o tratamento baseado no ciclo biológico dos fungos, regimes de modificação de dosagens, terapias combinadas, emprego de tecnologias para otimizar a liberação dos fármacos e cuidados profiláticos.

### 2.4.1 Terapia farmacológica sistêmica

Os tratamentos convencionais com griseofulvina e fluconazol, os quais são reconhecidamente efetivos contra dermatófitos, não são eficazes para o tratamento de onicomicoses por fungos não dermatófitos (SALAS-CAMPOS, GROSS-MARTÍNEZ e CARRILO-DOVER, 2009).

A terapêutica sistêmica com griseofulvina, derivados azólicos, dentre outros pode acarretar reações adversas, as quais podem ser reações locais, gastrintestinais, hepatotoxicidade e leucopenia. Além disso, a ineficiência terapêutica por resistência adquirida de algumas linhagens e o elevado custo dos fármacos limitam o tratamento (SOUZA et al., 2002).

Muitos alvos de ação dos fármacos utilizados na terapêutica atual já foram elucidados, com destaque para a respiração mitocondrial, a integridade da parede e/ou membrana das células, a divisão celular, a síntese de proteínas e a transdução de sinais. Ainda assim, os medicamentos disponíveis para a terapêutica podem ser citotóxicos para as células de mamíferos, o que pode ser atribuído, em parte, pela produção intracelular de radicais livres (KIM et al., 2011).

Essa terapêutica requer o monitoramento da função hepática, já que pode ocasionar hepatotoxicidade. Além disso, o número de possíveis interações medicamentosas pode restringir sua utilização, principalmente em pacientes idosos (LASENNA e TOSTI, 2015).

#### 2.4.1.1 Terapêutica com griseofulvina

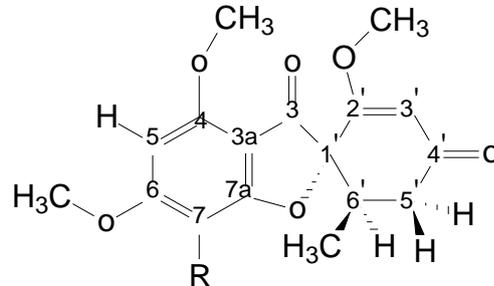
A griseofulvina apresenta baixa afinidade pela queratina ungueal e deve ser administrada na dose de 500 mg, 2 vezes ao dia, por 6 a 9 meses com taxa de cura micológica de 25,5 %. Esse fármaco tem sido substituído por medicamentos mais modernos como os azólicos e a terbinafina (HARDMAN, LIMBIRD e GILMAN, 2005; SIDRIM e ROCHA, 2004).

Apresenta atividade fungistática *in vitro* e sua ação se deve à ruptura do fuso mitótico, por sua interação com os microtúbulos polimerizados. Assim, a mitose fúngica é inibida e há produção de células multinucleadas, de paredes espessas e hifas encurvadas. Sua ação fungistática é exercida sobre os gêneros *Microsporium*,

*Trichophyton* e *Epidermophyton* (HARDMAN, LIMBIRD e GILMAN, 2005; SOARES et al., 2013).

Sua estrutura química pode ser observada na Figura 3.

Figura 3: Representação da estrutura química da griseofulvina.



Fonte: CAFËU et al., 2005.

#### 2.4.1.2 Terapêutica com fármacos azólicos

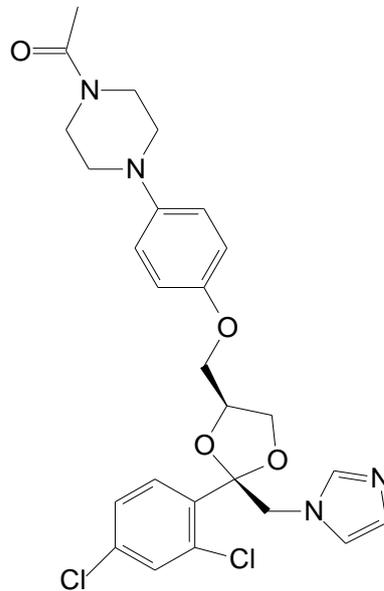
Os azólicos compreendem os fármacos imidazólicos e triazólicos. Ao primeiro grupo pertence o cetoconazol, enquanto fluconazol e itraconazol pertencem ao segundo. Os triazólicos sistêmicos são metabolizados mais lentamente e exercem menores efeitos sobre a síntese dos esteróides em humanos, que os imidazólicos (HARDMAN, LIMBIRD e GILMAN, 2005).

O primeiro azólico introduzido na prática clínica foi o cetoconazol, em 1980. A dose diária recomendada é de 200 mg/dia, por 4 meses. Apresenta maior afinidade pela queratina, mas seus efeitos colaterais são um dos limitantes da terapia. Outro azólico disponível para a terapia é o itraconazol, 200 mg/dia, durante 12 semanas ou em esquema de pulsoterapia, 400 mg/dia, por 1 semana, a cada mês, por 3-4 meses (unhas dos pés) ou 2 meses (unhas das mãos). Para este fármaco, a taxa de cura pode atingir 93,5 % em unhas dos pés. Dell Rosso (2014) apontou para o risco de hepatotoxicidade com o uso desse fármacos e de interações medicamentosas, principalmente em idosos. Outro ativo desta classe é o fluconazol, na dose de 150,00 a 450 mg/dia, com elevada biodisponibilidade oral e tolerabilidade, mas não é aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para alguns tipos de onicomicose. O tratamento com esses dois últimos fármacos tem elevado custo financeiro (DELARZE e SANGLARD, 2015; DELL ROSSO, 2014; SIDRIM e ROCHA, 2004).

Fármacos triazólicos e imidazólicos compartilham o mesmo mecanismo de ação, que corresponde à inibição da enzima esterol 14- $\alpha$ -demetilase. Essa inibição compromete a síntese do ergosterol na membrana citoplasmática fúngica e levam ao acúmulo de 14- $\alpha$ -metilesteróis. O acúmulo desses compostos pode acarretar na desagregação das cadeias dos fosfolípidos e comprometer as funções de sistemas enzimáticos ligados à membrana, como a Trifosfato de Adenosina (ATP)ase e enzimas do sistema de transporte de elétrons, inibindo, assim, o crescimento fúngico (HARDMAN, LIMBIRD e GILMAN, 2005; PEREIRA, O., 2009).

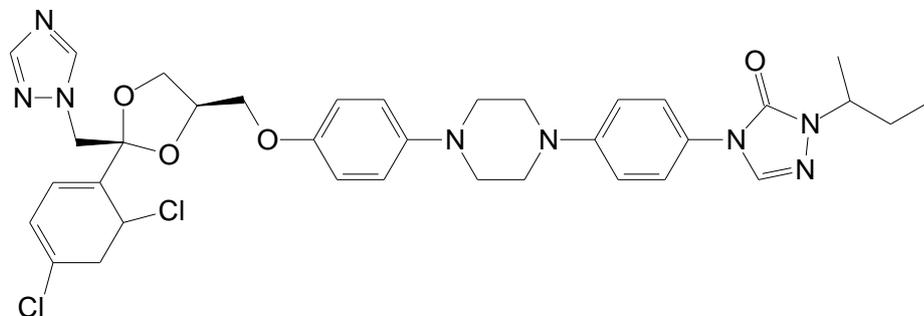
As estruturas químicas de cetoconazol, itraconazol e fluconazol podem ser observadas nas Figuras 4, 5 e 6 respectivamente.

Figura 4: Representação da estrutura química do cetoconazol.



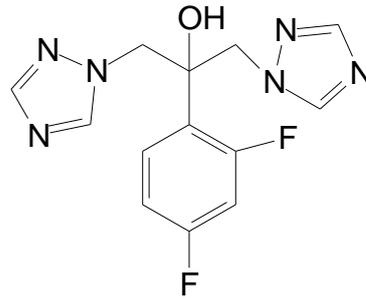
Fonte: EKROOS e SJÖGREN, 2006.

Figura 5: Representação da estrutura química do itraconazol.



Fonte: FRANÇA et al., 2014.

Figura 6: Representação da estrutura química do fluconazol.

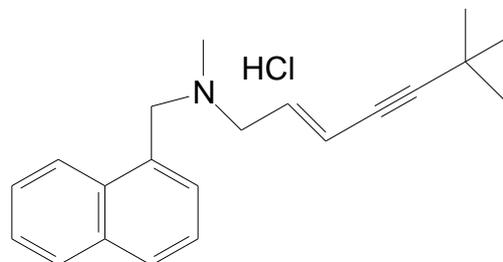


Fonte: FRANÇA et al., 2014.

### 2.4.1.3 Terapêutica com terbinafina

A terbinafina é uma alilamina, com estrutura representada na Figura 7, que deve ser utilizada na dose de 250 mg/dia por, geralmente, 3 meses (HARDMAN, LIMBIRD e GILMAN, 2005). Esse fármaco inibe a síntese do ergosterol, pela inibição reversível não competitiva da enzima fúngica esqualeno epoxidase, envolvida nas etapas iniciais da síntese de esteróis (HARDMAN, LIMBIRD e GILMAN, 2005; PEREIRA, O., 2009). A depleção de ergosterol e acúmulo de esqualeno levam a alterações na estrutura e funções da membrana plasmática, resultando em morte das espécies susceptíveis (MARTINEZ-ROSSI, PERES e ROSSI, 2008). Para Soares e colaboradores (2013), a terbinafina apresenta ação fungistática, mas é capaz de inibir todos os gêneros de dermatófitos. Seus efeitos adversos seriam inferiores aos observados com a griseofulvina e comparados aos produzidos pelo itraconazol. Apresenta baixa eficácia para o tratamento de infecções por *C. albicans* (DELL ROSSO, 2014).

Figura 7: Representação da estrutura química da terbinafina.



Fonte: SPEZIALI, 2012.

A taxa de cura com o seu uso pode alcançar 82 %, com a sua utilização por 12 semanas (SIDRIM e ROCHA, 2004). Também está disponível na versão para aplicação tópica a 1 % (DELL ROSSO, 2014).

#### **2.4.2 Terapia farmacológica tópica**

As terapias tópicas disponíveis podem ser utilizadas quando a matriz ungueal não foi afetada pela infecção; em casos de contra-indicação ao tratamento sistêmico ou em terapia combinada, sendo esta última considerada mais efetiva que a monoterapia, devido ao efeito sinérgico. Além disso, a terapia tópica pode ser utilizada na profilaxia pós-tratamento (NEGRONI, 2008; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA, 200-). Para Soares e colaboradores (2013), essa é a terapia usual contra onicomicoses.

As terapias tópicas apresentam, não raro, baixa eficácia clínica, quando comparadas às terapias orais, por conta da dificuldade de penetração e alcance das camadas mais profundas da unha. Práticas como o debridamento químico ou físico ou a remoção da unha afetada em combinação com a terapia tópica podem favorecer o tratamento (BHATT e PILLAI, 2015; DELL ROSSO, 2014; GHANNOUM e ISHAM, 2014).

A natureza do veículo da formulação, bem como as propriedades físico-químicas e a atividade antifúngica dos princípios ativos são fatores importantes que favorecem esse tipo de terapia (DELL ROSSO, 2014).

##### **2.4.2.1 Terapêutica tópica para onicomicoses leves**

Negróni (2008) destacou como terapia disponível o uso de solução alcoólica de tioconazol a 28 % com ácido undecilínico para casos leves de onicomicose, com menos de 25 % de acometimento da unha e em que haja impossibilidade de tratamento sistêmico. No entanto, essa terapia apresentou baixa taxa de cura.

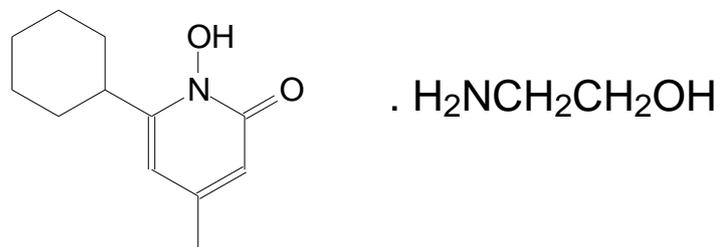
##### **2.4.2.2 Terapêutica com ciclopirox olamina**

As onicopatias provocadas por fungos também podem ser tratadas com o uso de ciclopirox olamina 8 %. Apresenta-se na forma de esmalte, o qual permite a

passagem transungueal e deve ser aplicado na unha uma vez ao dia, durante 48 semanas, conforme Ghannoum e Isham (2014).

Esta substância possui amplo espectro fúngico e também atividade antibacteriana. É capaz de quelar o íon ferro e inibir enzimas importantes para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos (GHELARD et al., 2014; MARTINEZ-ROSSI, PERES e ROSSI, 2008; NEGRONI, 2008). Como monoterapia, apresenta eficácia inferior a 50 % nas onicomicoses das mãos e 25 % nos pés, quando a invasão da superfície ungueal é menor que 30 % (NEGRONI, 2008). Na Figura 8, é possível observar a representação da estrutura química desse fármaco.

Figura 8: Representação da estrutura química de ciclopirox olamina.



Fonte: HARDMAN, LIMBIRD e GILMAN, 2005.

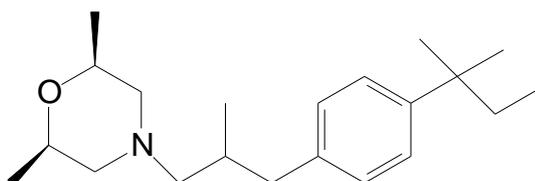
### 2.4.2.3 Terapêutica com amorolfina

Outra opção de tratamento é o emprego do esmalte de amorolfina a 5 %, o qual deve ser aplicado apenas 1 ou 2 vezes por semana, durante 6 meses a 12 meses, sendo ligeiramente mais eficaz que o ciclopirox olamina (GHANNOUM e ISHAM, 2014).

Essa substância possui ação fungicida devido à inibição de síntese do ergosterol, por ação sobre as enzimas 14- $\alpha$ -redutase e 7,8- $\alpha$ -isomerase (GHANNOUM e ISHAM, 2014; NEGRONI, 2008).

Sua estrutura química está representada na Figura 9.

Figura 9: Representação da estrutura química da amorolfina.



Fonte: MANFRINI, 2007.

Propicia taxa de cura clínica de 40 % para as unhas do pé e 60 % para as unhas das mãos (SIDRIM e ROCHA, 2004). Esse fármaco é aprovado para terapia na Europa, mas não nos Estados Unidos da América (EUA) (LASENNA e TOSTI, 2015).

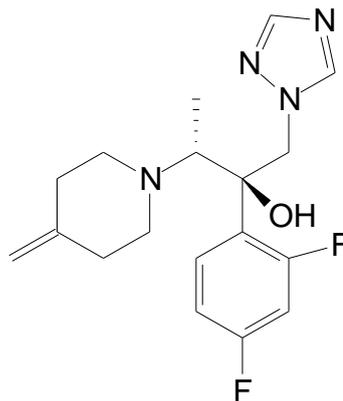
#### 2.4.2.4 Terapêutica com efinaconazol

Efinaconazol solução a 10 % é um novo triazólico e primeiro fármaco tópico pertencente a essa classe, avaliado para utilização em infecções leves a moderadas (BHATT e PILLAI, 2015; IWATA et al., 2014). Esse fármaco atua, como os demais azólicos, interferindo na biossíntese do ergosterol, por ação na enzima esterol 14- $\alpha$ -demetilase (SIU et al., 2013; TATSUMI et al., 2013). Em estudos de fase III, esse fármaco foi avaliado durante 48 semanas (GUPTA et al., 2014) e, segundo Lasenna e Tosti (2015) pode ser usado diariamente, por meses e sem necessidade de debridamento da unha.

Sua formulação foi preparada com etanol, ésteres lipofílicos e ciclometicona, sendo essa composição importante para a permeação do fármaco através da estrutura da unha (BHATT e PILLAI, 2015; LASENNA e TOSTI, 2015).

Sua estrutura química pode ser verificada na Figura 10 a seguir.

Figura 10: Representação da estrutura química do efinaconazol.



Fonte: SANTOS et al., 2015.

A solução mostrou atividade *in vitro* contra fungos dermatófitos e não dermatófitos, dentre eles *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* e *C. albicans*. Além disso, os resultados foram superiores aos obtidos com amorolfina e ciclopirox olamina (DELL ROSSO, 2014). Iwata e colaboradores (2014) informaram que o fármaco apresenta

baixo potencial de induzir resistência em dermatófitos, mas Siu e colaboradores (2013) informaram que essa possibilidade não pode ser excluída.

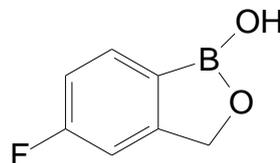
#### 2.4.2.5 Terapêutica com tavaborol

Tavaborol solução 5 % é um novo fármaco, aprovado pelo FDA para utilização em onicomicose das unhas dos pés, cujos agentes sejam *T. rubrum* ou *T. mentagrophytes* (DELL ROSSO, 2014; ELEWSKI et al., 2015). Nos ensaios clínicos realizados, o fármaco foi utilizado diariamente, durante 48 semanas. Possíveis reações ao seu uso seriam esfoliação, eritema e dermatite (ELEWSKI et al., 2015).

Atua inibindo a síntese de proteínas, por ação sobre a enzima leucil-ácido ribonucleico de transfência (tRNA) sintetase. Essa enzima participa da tradução do código genético e atua revisando e corrigindo erros enzimáticos que possam ocorrer durante essa tradução. Embora essa enzima também esteja presente em mamíferos, o fármaco foi seletivo para a enzima fúngica (DELL ROSSO, 2014; ELEWSKI et al., 2015).

Sua estrutura química pode ser observada na Figura 11 a seguir.

Figura 11: Representação da estrutura química de tavaborol.



Fonte: ELEWSKI et al., 2015.

#### 2.4.3 Avaliação do custo das terapias disponíveis no mercado

No Quadro 2, é possível verificar o preço máximo dos medicamentos utilizados na terapia das onicomicoses. Foram consideradas as alíquotas de 0 % a 19 % do Imposto sobre Circulação de Mercadorias e Prestação de Serviços (ICMS) para o estabelecimento da faixa de preços (BRASIL, 2016b). Esse levantamento de dados considerou a lista de medicamentos de referência da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2016a). Os fármacos efinaconazol e tavaborol não foram citados, pois ainda não são comercializados no Brasil (BRASIL, 2016a,b).

Quadro 2: Preços máximos ao consumidor de medicamentos para o tratamento das onicomicoses.

ICMS: Imposto sobre Circulação de Mercadorias e Prestação de Serviços

<b>Princípio ativo</b>	<b>Forma Farmacêutica</b>	<b>Unidade</b>	<b>Faixa de preço por unidade medicamentosa (ICMS 0 a 19 %) (R\$)</b>
Griseofulvina	Comprimido	Comprimido 500,00 mg	0,99 – 1,23
Cetoconazol	Comprimido	Comprimido 200 mg	3,15 – 3,89
Itraconazol	Cápsula	Cápsula 100 mg	11,32 – 13,96
Fluconazol	Cápsula	Cápsula 150 mg	46,24 – 57,09
Terbinafina	Comprimido	Comprimido 250 mg	7,46 – 9,21
Terbinafina	Solução tópica	Frasco (10 mg/g - 30 mL)	24,34 - 30,74
Ciclopirox olamina	Esmalte	Frasco (80 mg/g – 3 g)	91,33 – 154,55
Amorolfina	Esmalte	Frasco (50 mg/mL – 2,5 mL)	50,59 – 85,61

Fonte: BRASIL, 2016b.

Os dados supracitados, aliados ao fato de a terapia contra a onicomicose demandar tempo, tornam o tratamento de elevado custo para o paciente e confirmam as informações da literatura (SILVA, FARIA e DOIMO, 2011; MORAIS, 2013).

Vale ressaltar sobre as terapias antifúngicas que poucos fármacos efetivos estão atualmente disponíveis no mercado, em especial para o tratamento das dermatomicoses (PONNUSAMY et al., 2010). Na terapêutica da *tinea unguium*, em 25 % dos casos pode não haver resposta terapêutica satisfatória (PEREIRA, O., 2009). Dessa forma, o interesse por princípios ativos derivados de plantas, para uso na prática da terapêutica moderna, tem aumentado (PONNUSAMY et al., 2010).

O surgimento de linhagens de micro-organismos multirresistentes aos tratamentos farmacológicos convencionais (VAN ZYLA et al., 2010), dado o uso indiscriminado dos antifúngicos (LIMA et al., 2009), tem levado à busca por novas

substâncias ou associação de substâncias para uso terapêutico. Assim, os óleos essenciais têm sido testados e validados como promissores agentes anti-infecciosos (VAN ZYLA et al., 2010).

#### **2.4.4 Resistência fúngica às terapias disponíveis**

Apesar do número de fármacos antifúngicos existentes, somente quatro classes estão disponíveis na clínica e os alvos celulares são limitados, por conta de os fungos serem eucariotos, assim como os mamíferos. Além disso, a descontinuidade do tratamento e o desenvolvimento de resistência levam à infecções recorrentes. Episódios de resistência aos fármacos têm sido observados para todos os agentes antifúngicos. Vale considerar que pode ocorrer resistência cruzada, sugerindo um mecanismo de resistência alvo-específico (DELARZE e SANGLARD, 2015; SOARES et al., 2013).

A resistência pode ser intrínseca ou adquirida, sendo que, no primeiro caso, ocorre quando não há atividade do fármaco em espécies que não haviam sido expostas ao mesmo, ou seja, todos os membros da espécie apresentam essa característica. A resistência adquirida surge em populações que eram previamente sensíveis e o uso constante de antifúngicos pode selecionar indivíduos resistentes que predominarão na população (DELARZE e SANGLARD, 2015; MARTINEZ-ROSSI, PERES e ROSSI, 2008).

Em ambas as situações supracitadas, pode haver variação da atividade antifúngica. Mas essa atividade também pode ser influenciada pela tolerância antifúngica e por mecanismos de persistência. A tolerância consiste na capacidade do fungo sobreviver em concentrações superiores à CIM, com redução de nutrientes e do potencial de membrana, resultando em um estado de latência. Os fungos persistentes permanecem no hospedeiro, mesmo após o tratamento farmacológico e podem se originar a partir do aumento da tolerância. Esses fenômenos são reversíveis e diferem da resistência por não envolverem alterações genéticas (DELARZE e SANGLARD, 2015).

Ghelardi e colaboradores (2014) verificaram, em seus estudos, mutantes de *T. rubrum* resistentes à itraconazol, terbinafina e amorolfina. A resistência ao itraconazol foi mais expressiva, o que corrobora o fato de fármacos fungistáticos, como os azólicos, serem mais vulneráveis ao desenvolvimento de resistência

quando comparado aos de ação fungicida. Os autores não obtiveram mutantes resistentes ao ciclopirox olamina, que é um fármaco que não tem como alvo a biossíntese do ergosterol.

Martinez-Rossi, Peres e Rossi (2008) relataram que os fungos utilizam vias de transdução de sinal, mediante estresse, que levam a alteração na expressão de proteínas para se adaptar ao meio. Dentre essas proteínas, é possível citar os transportadores de efluxo multidrogas, que são proteínas de membrana, que se ligam a vários compostos, retirando-os de dentro das células, os quais podem ser responsáveis por muitas falhas terapêuticas e incluem os transportadores do tipo ABC. Para *T. rubrum*, dois transportadores do tipo-ABC (TruMDR1 e TruMDR2) foram identificados como importantes no processo de resistência nesse fungo, TruMDR1 é expresso na presença de várias drogas. Em *C. albicans*, uma subclasse PDR (*pleiotropic drug resistance*) de transportadores ABC, homólogos à TruMDR1, foi identificada (Cdr1p e Cdr2p). Para Ghelardi e colaboradores (2014), esses transportadores também podem estar relacionados ao mecanismo de resistência cruzada.

Mecanismos bioquímicos parecem estar envolvidos no processo de resistência, dos quais é possível citar a redução na captação do fármaco, alterações estruturais no sítio alvo, degradação do fármaco pelo fungo e elevação do efluxo do antifúngico. No meio intracelular, é possível verificar a amplificação, a transferência ou a deleção gênica, ocorrência de mutações pontuais, superexpressão da molécula alvo ou de bombas de efluxo, como os transportadores do tipo ABC acima mencionados (MARTINEZ-ROSSI, PERES e ROSSI, 2008; PERES et al., 2010b; SOARES et al., 2013).

No caso específico da terbinafina, a mutação no gene que codifica a enzima esqualeno epoxidase (Erg A), por substituição do aminoácido L 393F, que se liga a esse fármaco, pode levar à inibição da atividade antifúngica do mesmo, embora a função da enzima seja conservada, já que os fungos continuam a se desenvolver (MARTINEZ-ROSSI, PERES e ROSSI, 2008; SOARES et al., 2013).

No Quadro 3, é possível verificar alguns fármacos utilizados no tratamento de dermatofitoses, seu mecanismo de ação, o provável mecanismo de resistência e os genes envolvidos nesse mecanismo em *T. rubrum*.

Quadro 3: Mecanismos de ação, resistência e genes relacionados à resistência de fármacos antidermatofíticos.

<b>Fármaco</b>	<b>Mecanismo de ação</b>	<b>Provável mecanismo de resistência</b>	<b>Genes envolvidos no mecanismo de resistência</b>
Terbinafina	Inibição da enzima esqualeno epoxidase	Mutação na enzima alvo. Aumento do efluxo de fármaco. Adaptação ao estresse. Supressão de salicilato monoxigenase, sugerindo degradação do fármaco	TruMDR2, transportador tipo ABC
Cetoconazol	Inibição da enzima 14- $\alpha$ -lanosterol demetilase	Aumento do efluxo de fármaco. Supressão da enzima	TruMDR1, TruMDR2
Fluconazol	Inibição da enzima 14- $\alpha$ -lanosterol demetilase	Aumento do efluxo de fármaco. Adaptação ao estresse	TruMDR1, TruMDR2, transportador tipo ABC
Itraconazol	Inibição da enzima 14- $\alpha$ -lanosterol demetilase	Aumento do efluxo de fármaco	TruMDR1, TruMDR2
Griseofulvina	Inibição da mitose	Aumento das bombas de efluxo. Adaptação ao estresse	TruMDR1, TruMDR2, transportador tipo ABC

Fonte: Adaptado de MARTINEZ-ROSSI, PERES e ROSSI, 2008.

Um antifúngico eficiente deve associar amplo espectro e baixa ou nenhuma toxicidade. No caso específico da onicomicose, é necessário boa penetração na unha e sua manutenção no local por tempo adequado e em concentrações adequadas. Para o desenvolvimento de novos fármacos, um alvo molecular adequado deve ser conservado em um elevado número de espécies, mas não deve estar presente no hospedeiro. Nesse sentido, transportadores TDT seriam bons alvos moleculares, já que não foram identificados em humanos (MARTINEZ-ROSSI, PERES e ROSSI, 2008).

#### **2.4.5 Novas alternativas terapêuticas**

Ghannou e Isham (2014) informaram sobre as novas terapias disponíveis para o tratamento das onicomicoses, que consistem em uso de ultrassom, dispositivos a *laser*, terapia fotodinâmica e iontoforese. O uso de ultrassom mostrou atividade fungistática nas onicomicoses. A terapia à *laser* foi aprovada para o uso cosmético e precisa ser melhor avaliada para o uso terapêutico. A fototerapia baseia-se na irradiação da protoporfirina acumulada no interior da hifa, com consequentes danos a mesma. Já a iontoforese utiliza corrente elétrica (0,5 mA/cm<sup>2</sup>) e deve ser utilizada em associação à terapia tópica, a fim de facilitar a permeação do fármaco.

#### **2.4.6 Transporte de fármacos transungueal**

As propriedades físico-químicas das unhas indicam que elas se comportam como uma membrana gelatinosa hidrofílica (hidrogel) e sua anatomia e estrutura prejudicam a penetração dos fármacos. Alguns fatores influenciam no transporte das substâncias através da unha, que seriam o tamanho das moléculas, a ionização e o coeficiente de partição do fármaco, a natureza e o pH do veículo e a carga do soluto, a espessura e o grau de hidratação da unha (CHOUHAN e SAINI, 2012; KUMAR e RAJU, 2013).

Para tratar as desordens das unhas, os fármacos devem atravessar a placa ungueal e alcançar camadas profundas da placa, do leito e da matriz ungueal. Devido a sua estrutura de hidrogel, a unha é mais permeável a compostos polares. O uso de compostos como a ureia ou o ácido salicílico podem favorecer o transporte transungueal por suavizar a placa ungueal. Da mesma forma, compostos com

grupamentos sulfidril, como a cisteína, podem desestabilizar a estrutura de queratina, por clivagem das ligações dissulfeto das proteínas (KUMAR e RAJU, 2013).

A metodologia *in vitro* que utiliza células de difusão representa a técnica mais comum para a avaliação da permeação transungueal e também pode ser utilizada para a avaliação de compostos químicos com capacidade de potencializar a permeação de fármacos através da unha (CHOUHAN e SAINI, 2012). A adição de tais compostos às formulações visa melhorar as taxas de cura da monoterapia tópica (NAIR et al., 2009).

Na técnica de permeação com células de difusão, a formulação é aplicada na superfície dorsal da unha e amostras da solução em contato com a porção ventral são recolhidas em tempos determinados e, então, é calculado o fluxo do fármaco através da unha. Nessa técnica e nos demais estudos de permeação *in vitro*, cascos de animais como porco ou boi podem ser utilizados em substituição à unha humana. No entanto, os cascos de mamíferos tendem a absorver mais água que a unha humana, sendo mais permeáveis, o que gera certa limitação à técnica. Cortes de unhas obtidos de voluntários sadios também podem ser utilizados nos ensaios. Porém, nesses casos, a placa ungueal disponível é pequena, tornando necessário comparar os resultados com o uso de unhas de cadáver humano (ELKEEB et al., 2010).

## **2.5 Espécies vegetais como fonte de moléculas com propriedades medicinais e potencial antifúngico**

Desde a Idade Antiga, o homem tem utilizado as plantas no tratamento de enfermidades. A terapêutica moderna, que dispõe de um considerável número de medicamentos, desenvolveu-se com o auxílio dos produtos de origem natural (TAKAKI, MODESTO JR. e FIGUEIREDO, 2007).

A ocorrência de um número elevado de vegetais resistentes a fitopatógenos chama a atenção para a existência de substâncias com atividade fungicida nessas plantas (VENTUROSOSO et al., 2010). Estudos apontam que cerca de 60 % dos óleos essenciais vegetais apresentam atividade antifúngica, enquanto aproximadamente 35 % têm propriedades antibacterianas (LIMA et al., 2006).

Pagiotti e colaboradores (2011) enfatizaram que o aumento da resistência fúngica e o fato de muitos dos antifúngicos disponíveis apresentarem atividade fungistática representam preocupação na assistência à saúde, sendo necessário o desenvolvimento de novos fármacos e que os vegetais poderiam representar fontes de novas moléculas bioativas.

Muitas substâncias de origem vegetal apresentam propriedades medicinais já descritas (CANESCHI et al., 2015; ZIMMERMANN-FRANCO et al., 2014). Algumas são utilizadas na alimentação há longo tempo e as especiarias e outros materiais aromáticos vegetais, além de suas propriedades aromatizantes e flavorizantes, apresentam atividade na preservação dos alimentos, bem como atividades farmacêuticas (SHAN, BROOKS e CORKE, 2007).

Dentre esses produtos de origem vegetal, é possível destacar a canela, que é a casca seca obtida a partir das espécies pertencentes ao gênero *Cinnamomum*. É utilizada como especiaria em todo o mundo e seu óleo essencial contém substâncias bioativas com destaque para o cinamaldeído (FAIKOH, HONG e HU, 2014), composto mais abundante e importante, além de cumarinas, eugenol ou álcool cinamílico (LEE et al., 2010).

O gênero *Cinnamomum* pertence à família Lauraceae e compreende cerca de 250 espécies (WANG, WANG e YANG, 2009), com destaque para *C. zeylanicum* e *C. cassia*. Marques, Barros e Costa (2004) descreveram as lauráceas como uma das famílias mais representativas da Mata Atlântica no Rio de Janeiro, ocorrendo nos mais diversos ecossistemas.

O óleo essencial da canela é um líquido amarelado, que tende a escurecer ou tornar-se mais viscoso com o tempo ou exposição prolongada ao ar. Seu sabor e odor são característicos e apresenta baixa solubilidade em água, mas solubilidade em etanol ou ácido acético glacial. Em relação à toxicidade, esse óleo apresenta dose letal média (DL<sub>50</sub>) estimada para a aplicação dérmica de 690 mg/kg (CABRERA, 2010).

As cascas das espécies desse gênero contêm taninos condensados na forma de polímeros de proantocianidinas (SHAN, BROOKS e CORKE, 2007). Dearlove e colaboradores (2008) descreveram a composição das espécies do gênero *Cinnamomum* contendo cinamaldeído, furfural, cuminaldeído, eugenol e cariofileno. Abdelwahab e colaboradores (2014) relataram que o óleo essencial oriundo das plantas desse gênero pode conter cinamaldeído, linalol, cânfora, 4-terpineol, 1,8-

cineol, eugenol, safrol, muruleno,  $\alpha$ -cadinol, D-germacreno,  $\alpha$ -terpineol,  $\alpha$ -cadieno, 1,6-octadien-3-ol-3,7-dimetil e dietanoato de 1-fenilpropano-2,2-diol. O valor econômico do óleo essencial proveniente dessas plantas depende da espécie e da parte do vegetal utilizada (LIMA et al., 2005).

O óleo de canela possui emprego nas indústrias de alimentos (conservação e como flavorizante), cosméticos e farmacêutica (ABDELWAHAB et al., 2014). A canela possui propriedades medicinais e pode ser utilizada no tratamento de doenças gastrintestinais, possui ações anti-inflamatória, anestésica, antialérgica, antiulcerosa, antipirética e antioxidante (VARALAKSHMI et al., 2014). Varalakshmi e colaboradores (2014), ao estudarem o extrato obtido a partir da casca de *C. zeylanicum* (sinonímia *C. verum*), verificaram atividade antimicrobiana comparável à ampicilina frente a bactérias Gram-positivas. Esses autores observaram, ainda, que o extrato metanólico dessa espécie apresentava capacidade de induzir apoptose em células de hepatoma humano, o que indicou a atividade anticâncer do mesmo.

Shan, Brooks e Corke (2007) avaliaram o extrato bruto de *C. burmannii*, proveniente da Indonésia, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa acoplados ao espectrômetro de massa. Os dados mostraram que os constituintes majoritários foram E-cinamaldeído e proantocianidina/(epi) catequinas. A análise da atividade antimicrobiana, utilizando esses constituintes, revelou que E-cinamaldeído foi ativo contra *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* sorotipo Anatum, com concentração inibitória mínima (CIM) de 125 – 500  $\mu\text{g/mL}$  e concentração bactericida mínima de 250 – 2500  $\mu\text{g/mL}$ . As proantocianidinas também apresentaram atividade contra esses micro-organismos, com CIM de 78,1 - 2500  $\mu\text{g/mL}$  e concentração bactericida mínima de 78,1 a  $\geq 2500 \mu\text{g/mL}$ .

Estudos mostraram que as plantas pertencentes a esse gênero possuem ação antifúngica (ABDELWAHAB et al., 2014; NEGRI et al., 2014; TEJESWINI et al., 2014; YEH, LIN e CHANG, 2014) e que essa ação pode ser atribuída a seu constituinte majoritário, o cinamaldeído (TEJESWINI et al., 2014).

Shen e colaboradores (2015) verificaram atividade do cinamaldeído frente a *T. rubrum* e *C. albicans* a 20 e 40  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Lopes e colaboradores (2014), incorporaram essa substância a filmes de celulose, na concentração de 10 % e verificaram a inibição do crescimento de micro-organismos, inclusive de *Fusarium oxysporum*.

O cinamaldeído, um aldeído cinâmico, é um alilbenzeno (LIMA et al., 2005) presente no óleo essencial de canela na forma de dois estereoisômeros, Z-cinamaldeído e E-cinamaldeído (BARKMAN, 2001). É o principal constituinte desse óleo essencial, o qual tem sido utilizado como aditivo alimentar, condimento e flavorizante, devido a suas propriedades carminativas, antioxidante e preservativa (NATH, BARUAH e KANJILAL, 2006) nas concentrações de 9,00 e 4900,00 partes por milhão (ppm) (NOSTRO et al., 2012).

Além disso, foi descrito como inibidor da xantina-oxidase (LEE et al., 2010), como possuidor de potencial antidiabetogênico (LEE et al., 2010) e de propriedades antifúngicas (JHAM et al., 2005; CABRERA, 2010). É considerado um agente antimicrobiano de amplo espectro, capaz de atuar sobre bactérias resistentes a fármacos e formadoras de biofilmes, possuindo efeitos sobre a estrutura e função da membrana plasmática (SHAN, BROOKS e CORKE, 2007; BARBOSA, 2010; NOSTRO et al., 2012).

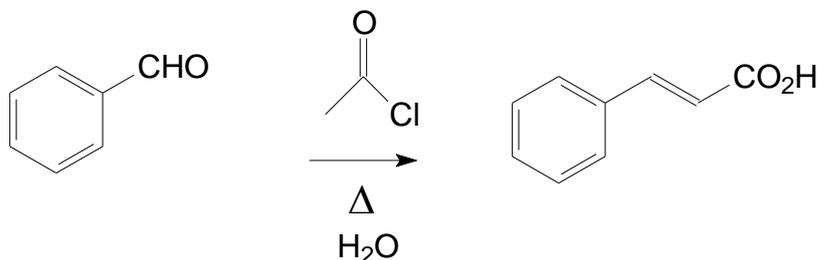
O cinamaldeído é considerado também inibidor do crescimento de bactérias, fungos filamentosos e leveduras, o qual pode interferir com a ATPase mitocondrial tipo-F e promover a redução da concentração intracelular de ATP (SHREAZ et al., 2011; KHAN et al., 2012). Para Shreaz e colaboradores (2010; 2011), a atividade antimicrobiana desse composto se dá por ação na membrana do micro-organismo e tanto o anel aromático, quanto a cadeia alifática afetam a atividade antifúngica. Kim e colaboradores (2011) descreveram que os derivados do ácido cinâmico são compostos fenólicos, capazes de promover a ruptura da homeostasia do sistema redox celular, com consequente inibição do crescimento microbiano. Esses dados podem ser úteis na elucidação do mecanismo de ação desse composto.

Pode ser utilizado na formulação de polímeros para fabricação de equipamentos biomédicos ou embalagens de alimentos, por sua capacidade de inibir o crescimento microbiano e a formação de biofilmes (NOSTRO et al., 2012). Amalaradjou, Kim e Venkitanarayanan (2014), citaram também que o *trans*-cinamaldeído foi capaz de inibir a síntese de biofilmes pelo micro-organismo *Cronobacter sakazakii*, que é um patógeno de origem alimentar, ao qual se associa alta mortalidade em neonatos e lactentes.

Esse composto foi sintetizado pela primeira vez por Chiozza, em 1854. Posteriormente, Perkin realizou a síntese do ácido cinâmico, a partir da reação de condensação entre o anidrido acético e o benzaldeído e Bertagnini substituiu o

anidrido acético por cloreto de acetila, para a obtenção desse produto (Figura 12) (PAPEO e PULICI, 2013; YOON, CHA e KIM, 2013).

Figura 12: Reação de obtenção do ácido cinâmico.



Fonte: PAPEO e PULICI, 2013.

A redução desse ácido carboxílico leva à obtenção do aldeído correspondente, nesse caso, o cinamaldeído. Nyamunda, Moyo e Fidelis (2012) reportaram também a oxidação do álcool cinamílico a cinamaldeído, com a utilização dos catalisadores paládio e platina.

Amalaradjou, Kim e Venkitanarayanan (2014) informaram que a *Food and Drug Administration* (FDA) avaliou o *trans*-cinamaldeído (correspondente ao isômero E) como molécula considerada como geralmente segura. Também possui propriedades antipiréticas e analgésicas descritas, além de atividade inseticida, antibacteriana, imunomoduladora e ação sobre a coagulação intravascular (NATH, BARUAH e KANJILAL, 2006).

Além disso, Shreaz e colaboradores (2013) verificaram que o cinamaldeído provocou cerca de 10,1 % de hemólise em células humanas, contra 20 % provocada pelo fluconazol. Dessa forma, os autores consideraram esse composto como de toxicidade limitada

Khan, Ahmad e Cameotra (2013) observaram que o cinamaldeído a 18 µg/mL ocasionou 1,84 % de hemólise contra 3,56 % da anfotericina B a 0,125 µg/mL. E Koleva, Madden e Cronin (2008) observaram que o cinamaldeído não é um composto mutagênico, uma vez que não foi capaz de formar adutos com o ácido desoxirribonucleico (ADN). Informaram ainda que esse composto provocava sensibilização da pele por meio de adição tipo Michael. Nesse tipo de reação, o eletrófilo se liga a regiões nucleofílicas de polipeptídeos, com a formação de proteínas alteradas antigênicas, as quais são expressas por células de *Langerhans*, acarretando a proliferação de células T e o consequente processo de sensibilização.

Outra planta utilizada como especiaria e na medicina popular é *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry (sinonímia *Eugenia caryophyllata*, *Eugenia*

*caryophyllus*, *Eugenia aromatica*, *Caryophyllus aromaticus*, *Jambosa caryophyllus*) (BRASIL, 2003), popularmente conhecida como cravo-da-índia (ASCENÇÃO e FILHO, 2013), a qual pertence à família Myrtaceae, de origem asiática, aclimatada na África e no Brasil. Dois produtos da árvore do cravo estão disponíveis no mercado: o cravo, que é o botão floral dessecado e o óleo essencial extraído dos botões, folhas e caule (RAZAFIMAMONJISON et al., 2014). O óleo essencial possui propriedades medicinais (FILHO e RODRIGUES, 2012; FLORES, BECK e SILVA, 2016) e pode ser utilizado como preservativo de alimentos, não sendo prejudicial para a saúde humana ou meio ambiente (XING et al., 2012). Esse óleo é composto por uma mistura de terpenos voláteis cíclicos e alifáticos e fenilpropanoides (SANTIN et al., 2011).

O eugenol é o constituinte mais importante desse óleo (mínimo de 75 %) (BRASIL, 2003) e há relatos de atividade antimicrobiana atribuída a esse componente (XING et al., 2012). Joseph e Sujatha (2012) conferiram ao óleo de cravo propriedades antioxidantes, antimutagênicas, antiulcerogênicas e antiparasitárias. Além disso, possui ação anestésica, analgésica e foi amplamente utilizado na odontologia (PINTO et al., 2009).

Já Karmakar e colaboradores (2012) afirmaram que, além do eugenol, o cravo apresentava como constituintes o  $\beta$ -cariofileno e o acetato de eugenol. Esses dados corroboram os achados de Santim e colaboradores (2011), que evidenciaram essa mesma composição para o óleo de cravo (89,6 % de eugenol; 8,6 % de cariofileno e 1,7 % de acetato de eugenol). Soni e Dahiya (2014) informaram que os principais constituintes dos botões florais são os fenilpropanoides como eugenol, carvacrol, timol e cinamaldeído. No entanto, a origem do vegetal influencia qualitativa e quantitativamente na composição química. Vale considerar que o teor de eugenol é baixo na fase de botão jovem, mas crescente e alcança percentual máximo na fase de frutificação completa, evento contrário ocorre com o acetato de eugenol (RAZAFIMAMONJISON et al., 2014).

Além de ser o principal constituinte do óleo de cravo, o eugenol também pode ser obtido a partir de plantas dos gêneros *Myristica*, *Cinnamomum* e *Ocimum* e, em menor percentual, a partir de espécies de *Cymbopogon* (PEREIRA, MENDES e LIMA, 2013).

Ahmad e colaboradores (2010) verificaram que o eugenol apresentava atividade fungicida frente à *C. albicans*, provavelmente, por interferência na

biossíntese do ergosterol. Fontenele e colaboradores (2011) também observaram ação desse composto frente a *M. canis* (MIC = 39 µg/mL) e à *C. albicans* (MIC = 150 - 620 µg/mL).

O eugenol, ou 4-alil-2-metoxifenol, é um composto fenólico (BAKKALI et al., 2008), com propriedades *in vivo* e *in vitro* contra o gênero *Candida*, bem como atividade antidermatofítica *in vitro* (LEE et al., 2007). Além da ação antifúngica, Gülçin (2011) relatou ainda que o composto apresentava propriedades anestésicas, bactericidas, bacteriostáticas, dentre outras. Jaganathan e colaboradores (2011) verificaram que o eugenol possuía efeito antiproliferativo e indutor de apoptose em células de câncer de cólon humano, dependentes da concentração e linhagem celular avaliada, sendo as propriedades biológicas desse composto atribuídas ao grupo fenólico (PEREIRA, MENDES e LIMA, 2013).

O eugenol é um composto líquido com aspecto amarelado, com sabor ardente e picante e que escurece em contato com o ar (ASCENÇÃO e FILHO, 2013). É considerado seguro pelo FDA, com dose diária máxima recomendada de 2,5 mg/kg (GÜLÇİN, 2011) e dose letal média, para ingestão oral em ratos, de 3000 mg/kg (GONG et al., 2016). Affonso e colaboradores (2012) citaram que o eugenol apresentou baixo potencial de alergenicidade e foi bem tolerado pela pele, quando incorporado a produtos de higiene e perfumes.

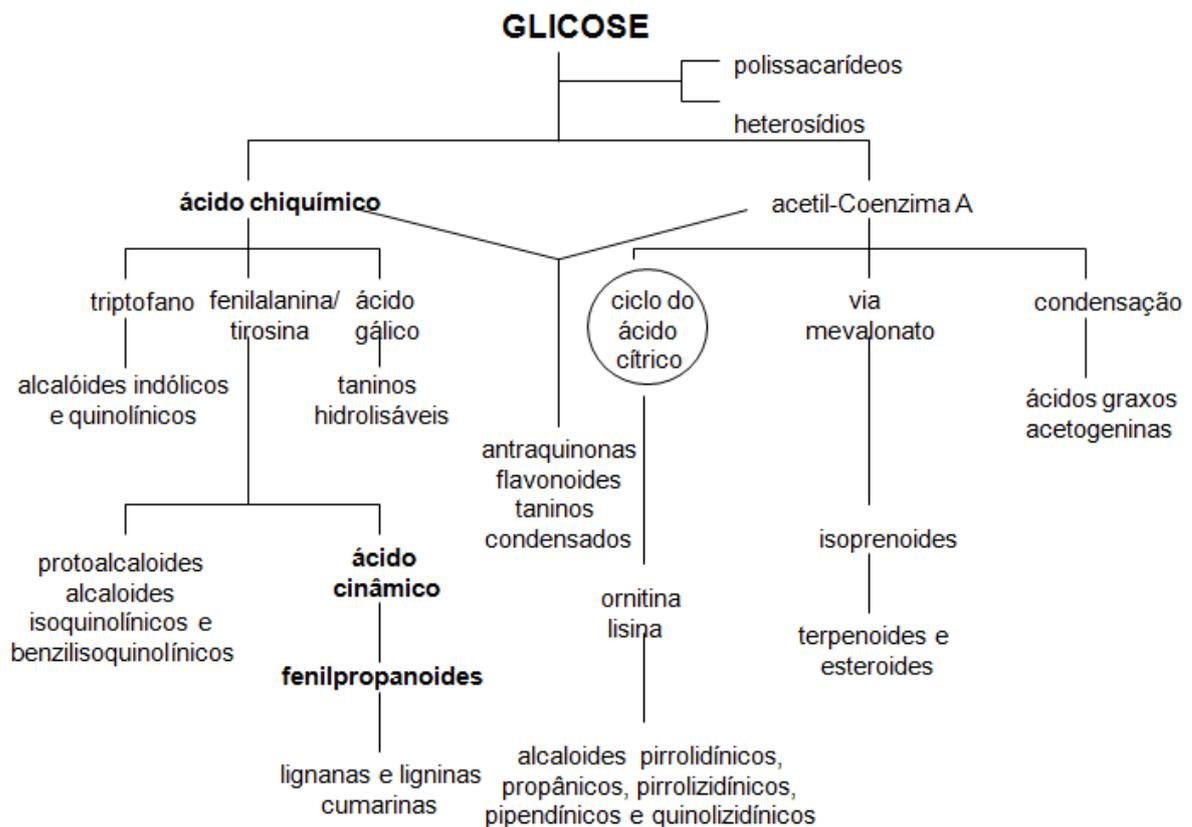
Brauer, Morris e Howe descreveram, em 1963, a síntese orgânica de um dos isômeros de eugenol, o 3-alil-2-metoxifenol, a partir da demetilação parcial do 1-alil-2,3-dimetoxibenzeno. Os estudos de Cheng e colaboradores (2011) avaliaram a ação de eugenol e seus derivados contra o fungo *Rhizoctonia solani* e os autores verificaram que os compostos que apresentavam o grupamento hidroxila livre foram mais ativos. No entanto, em relação à toxicidade dos compostos, os autores constataram que a dupla ligação entre os carbonos 7 e 8 da cadeia alifática era responsável pelo aumento da lipofilicidade e toxicidade dos compostos. Xie e colaboradores (2015) confirmaram, para o eugenol e demais componentes do óleo essencial, que a posição da dupla ligação influenciava nas propriedades biológicas dos compostos. Além disso, a lipofilicidade poderia estar relacionada à toxicidade desses compostos.

Abd-Elsalam e Khokhlov (2015), ao produzirem uma nanoemulsão óleo em água, utilizando o eugenol, verificaram atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* frente a *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, patógeno capaz de afetar plantas. Já Khan e

Ahmad (2011) observaram que o eugenol foi um dos compostos ativos frente a duas linhagens de *T. rubrum* (IOA-9 e MTCC 296) resistentes a fluconazol e itraconazol.

O cinamaldeído e o eugenol foram escolhidos para o desenvolvimento dessa pesquisa devido ao seu potencial antifúngico. A escolha se baseou, ainda, no fato de ambos apresentarem a mesma via biossintética nos vegetais, já que, biogeneticamente, são compostos da rota do ácido chiquímico (NATH, BARUAH e KANJILAL, 2006). São provenientes do metabolismo secundário das plantas (GARCÍA e CARRIL, 2009) e pertencentes à classe dos fenilpropanoides (DARVISH et al., 2013). O esquema resumido da produção de componentes fenilpropanoides a partir da glicose pode ser verificado na Figura 13.

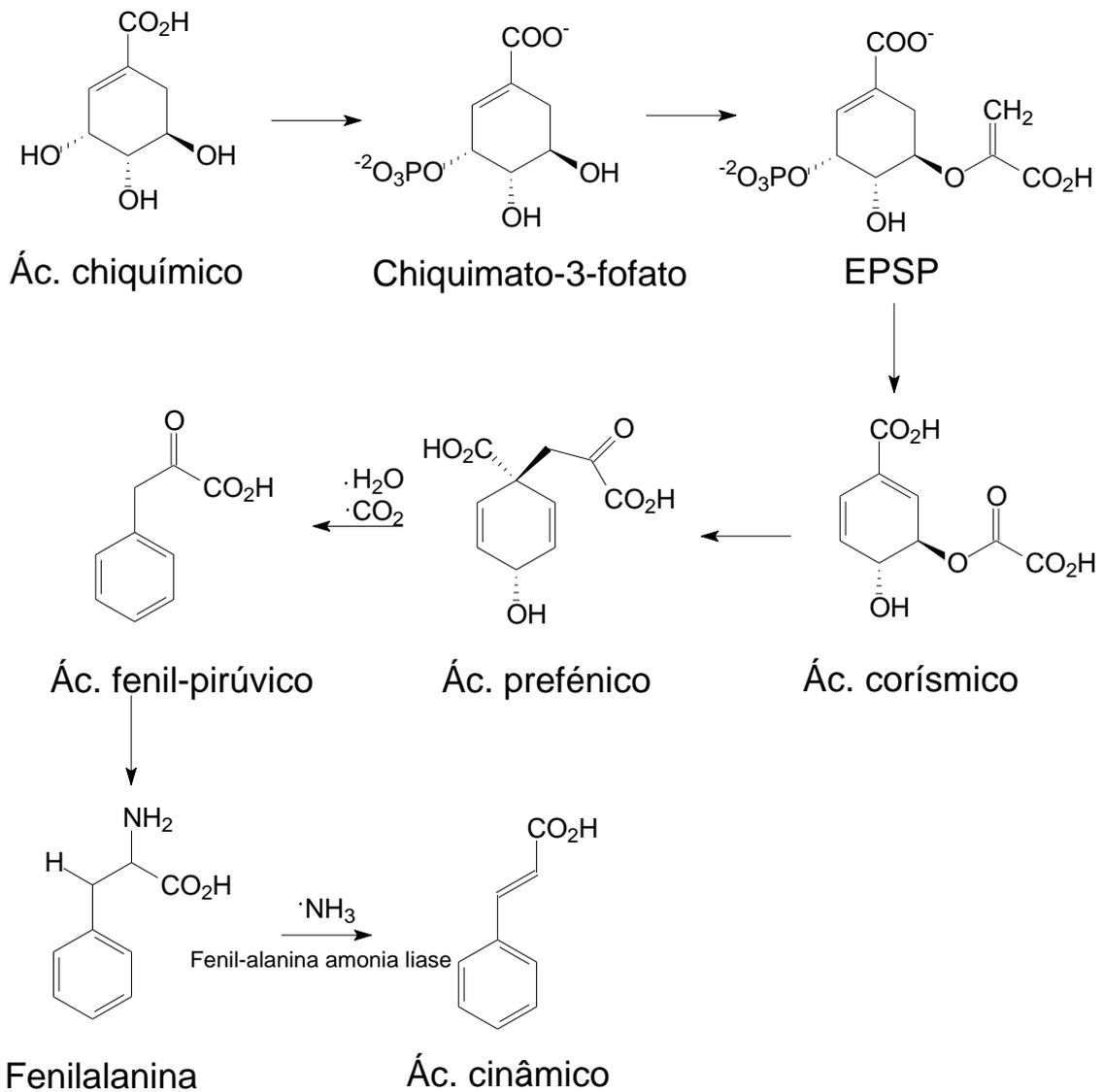
Figura 13: Representação esquemática da produção de fenilpropanoides a partir da glicose.



Fonte: Adaptado de MONTAGNER, 2007.

Na Figura 14, é possível verificar os compostos intermediários na síntese do ácido cinâmico, a partir do ácido chiquímico.

Figura 14: Representação esquemática de compostos intermediários na síntese de ácido cinâmico.

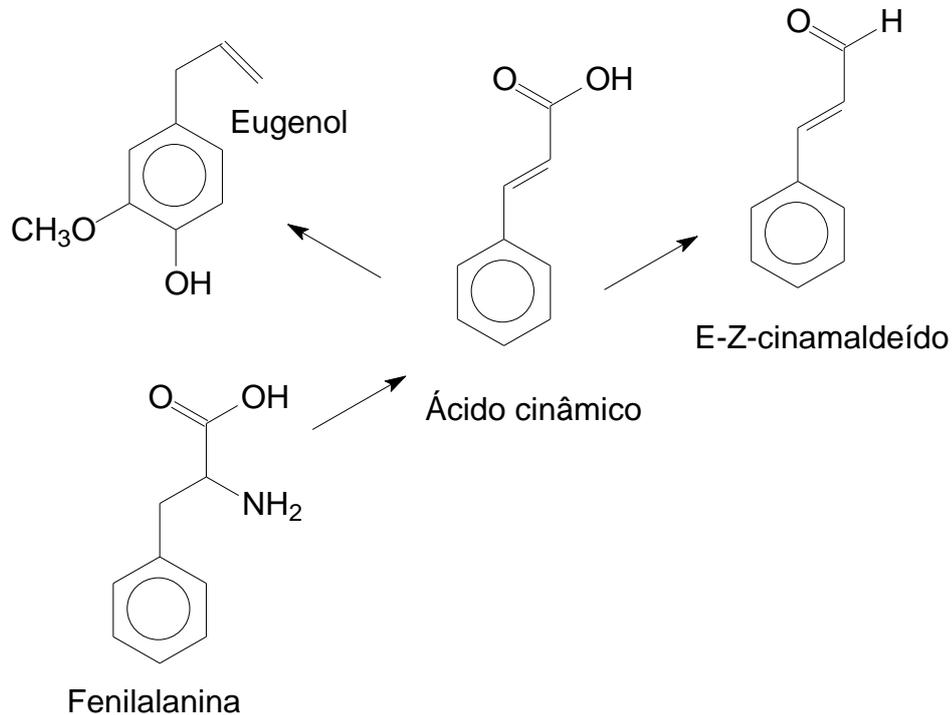


EPSP: 5-enolpiruvil chicamato-3-fosfato.

Fonte: Adaptado de CZELUSNIAK et al., 2012.

Por meio da via do ácido chiquímico, tem-se a formação do aminoácido aromático fenilalanina, o qual, pela ação da enzima fenilalanina amoníase, é convertida à ácido cinâmico. Este, por sua vez, pode sofrer reduções enzimáticas e originar alilbenzenos e propenilbenzenos (OOTANI et al., 2013), o que pode ser verificado no Figura 15.

Figura 15: Síntese de cinamaldeído e eugenol a partir da fenilalanina.

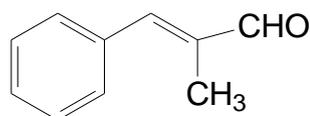


Fonte: Adaptado de BARKMAN, 2001.

A fim de verificar se a associação de cinamaldeído e eugenol era capaz de potencializar o efeito antifúngico dos compostos isolados, o estudo também teve por objetivo a análise de proporções definidas desses constituintes a 75 % de cinamaldeído e 25 % de eugenol, 50 % de cada componente e 25 % de cinamaldeído e 75 % de eugenol.

A terceira substância selecionada para a análise foi o produto sintético  $\alpha$ -metil-*trans*-cinamaldeído, uma vez que estudos mostraram que os derivados sintéticos do cinamaldeído apresentavam melhor atividade biológica (NORDQVIST et al., 2011). Além disso, o aumento da lipofilicidade era capaz de promover a redução da toxicidade e potencializar a ação antifúngica (KHAN et al., 2012).

Esse derivado metilado do cinamaldeído também apresenta propriedades contra leveduras do gênero *Candida* descritas (KHAN et al., 2012; SHREAZ et al., 2011). A estrutura química desse composto pode ser verificada na Figura 16.

Figura 16: Estrutura química do  $\alpha$ -metil-*trans*-cinamaldeído.

Fonte: CHENG et al., 2011.

A presença do grupamento metil, na cadeia alifática, aumenta a lipofilicidade da molécula, o que pode acarretar o aumento da efetividade do composto. Além disso, o  $\alpha$ -metil-*trans*-cinamaldeído reage mais lentamente com as aminas, reduzindo a sensibilização sobre a pele, quando comparado ao cinamaldeído (SHREAZ et al., 2011).

Kong e colaboradores (2007) descreveram que essa substância apresentava ação contra o nematódeo *Bursaphelenchus xylophilus*. No entanto, existem poucos estudos que avaliaram suas propriedades biológicas e, em grande parte dos trabalhos, tal composto é utilizado como reagente na síntese orgânica de novos compostos químicos como 4-ciano e 4-nitro- $\alpha$ -etil-*trans*-cinamaldeído (GUTMANN et al., 2014); indolizinas (KIM et al., 2007) e iminolactonas (LU e LIM, 2008).

Bisogno e colaboradores, em 2007, relataram a síntese de 22 compostos derivados do ácido cinâmico, dentre os quais foi verificada atividade contra fungos do gênero *Aspergillus*. O derivado designado por 16 [ácido acrílico (E)-3-(4-metóxi-3-(3-metilbut-2-enil)fenil] apresentou CIM de 1,25  $\mu$ g/mL frente a *A. niger* ATCC 11394, o que, segundo os autores, o tornava comparável ao fármaco miconazol. Em 2013, Korosec e colaboradores sintetizaram 42 derivados do ácido cinâmico e observaram atividade de 7 derivados frente a *Cochliobolus lunatus* MUCL 38696 e 2 frente a *A. niger* N402 cspA1 e *Pleurotus ostreatus* Plo5. Observaram ainda que, em geral, a presença de grupos retiradores de elétrons no anel aromático favorecia a atividade antifúngica. Quatro desses compostos eram inibidores competitivos da enzima benzoato-4-hidroxilase ou CYP53A15, envolvida no metabolismo de compostos aromáticos pela célula fúngica.

## 2.6 Microscopia eletrônica

### 2.6.1 Microscopia eletrônica de varredura

O microscópio óptico tem resolução aproximada de 200 nm (CASTRO, 2002). Limita-se ao aumento de 2000 vezes, em função do efeito da difração, devido ao comprimento de onda da radiação incidente (DEDAVID, GOMES e MACHADO, 2007). Já o microscópio eletrônico de varredura tem resolução de até 1 nm, sendo importante ao desenvolvimento de pesquisas (DEDAVID, GOMES e MACHADO, 2007).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica que fornece informações de detalhes das estruturas, pela utilização de aumentos de até 300.000 vezes e pode ser utilizada em várias áreas do conhecimento. A imagem eletrônica de varredura é formada pela incidência de um feixe de elétrons no material, sob condições de vácuo (DUARTE et al., 2003). Esse pequeno feixe de elétrons explora a superfície do material, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmite o sinal do detector a uma tela catódica, cuja varredura está sincronizada com o feixe incidente (DEDAVID, GOMES e MACHADO, 2007).

Essa incidência promove a emissão de elétrons secundários; retroespalhados (DUARTE et al., 2003); *auger*, que são elétrons com energia em torno de 1500 elétron-volts e que depende do elemento emissor e sua ligação química (DEDAVID, GOMES e MACHADO, 2007) e absorvidos; bem como raios X e catodoluminescência. A imagem gerada, em tons de cinza, é a representação do mapeamento e contagem dos elétrons secundários e retroespalhados emitidos pelo material avaliado (DUARTE et al., 2003). A resolução da imagem de elétrons secundários corresponde ao diâmetro do feixe, que varia em função das especificações do equipamento, além de corrente elétrica local e condições de vácuo (DUARTE et al., 2003).

A amostra a ser avaliada deve ser representativa da situação a ser analisada e deve passar por processo de fixação química, para a manutenção da forma. Após esse procedimento, o material é desidratado com etanol ou acetona, que, posteriormente, podem ser substituídos por gás carbônico (CO<sub>2</sub>) em equipamento de secagem em temperatura de ponto crítico. A montagem do espécime é feita sobre

suporte de alumínio (*stub*) e o material é coberto por ouro ou carbono, para torná-lo bom condutor térmico ou elétrico (CASTRO, 2002).

O microscópio eletrônico de varredura possui grande profundidade de foco e, conseqüentemente, a topografia superficial dos objetos sólidos pode ser facilmente avaliada e as micrografias têm aspecto tridimensional (GALLETI, 2003; TIMM, 2005).

### **2.6.2 Microscopia eletrônica de transmissão**

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) permite analisar detalhes mais finos de uma estrutura celular ou organização molecular de vírus ou constituintes sub-celulares. Torna possível obter informação sobre constituintes internos das células (GALLETI, 2003). Nessa técnica, um feixe de elétrons acelerado por alta tensão atravessa e interage com uma amostra transparente. Utiliza as fontes de elétrons termoiônicas e de emissão de campo. As amostras avaliadas por esse método devem ser finas a ponto de serem transparentes aos elétrons (MANNHEIMER, 2002). Esse feixe de partículas carregadas negativamente tem comprimento de onda na ordem de 0,01 nm. Os elétrons são gerados pelo aquecimento de um filete de tungstênio e acelerados por uma diferença de potencial entre o cátodo e o ânodo. Essa técnica permite alcançar aumentos de, aproximadamente, 500000 vezes, o que possibilita visualizar estruturas de, aproximadamente, 0,1 nm (SILVA, 2009).

Nesse método, a formação da imagem depende do tipo de interação que o feixe sofre ao atravessar a amostra e da espessura dessa última (ROSA, 2008). No preparo do material para a análise também devem ser empregados fixadores como glutaraldeído, tetróxido de ósmio ( $\text{OsO}_4$ ), paraformaldeído e permanganato de potássio. As amostras fixadas devem ser posteriormente incluídas em resinas, como a epóxi e cortadas com a utilização do ultramicrotomo (TIMM, 2005).

Essa técnica permite alcançar alta resolução, mas é um equipamento complexo, que exige amostras extremamente finas e é difícil obter informações sobre as estruturas em três dimensões (GALLETI, 2003).

## 2.7 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é a técnica utilizada para a identificação das células com base em seu tamanho, granulosidade ou intensidade de fluorescência emitida e, para isso, faz uso de anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos. As células da amostra são mantidas em suspensão e introduzidas numa câmara de fluxo vibratória, com solução tampão, sob um fluxo de 500 a 4000 células por segundo. Ao passarem, individualmente, por essa câmara, um *laser* incide sobre essas células, as quais são dispersas em várias direções, de acordo com sua morfologia (tamanho, topografia, estrutura interna e densidade óptica). Embora tenha custo elevado e requeira profissional capacitado para a operação do equipamento, essa técnica permitiu a avaliação do comportamento celular e se tornou a técnica alternativa na avaliação de substâncias puras e extratos vegetais (MACHADO JÚNIOR et al., 2006; NAKAGE et al., 2005).

Benaducci (2009) utilizou essa técnica para a avaliação da susceptibilidade de fungos e informou que também se aplica à elucidação do mecanismo de ação de compostos. Morales (2009) confirmou que, além da verificação do tamanho das células e susceptibilidade a compostos, a técnica permite obter informações sobre a viabilidade celular e sobre parâmetros intrínsecos (componentes capazes de emitir fluorescência). Já os parâmetros extrínsecos como ácidos nucleicos, proteínas, íons, pH, potencial de membrana e mitocondrial, fluidez da membrana, requerem o uso de sondas fluorescentes para essa avaliação.

Dentre os fluorocromos disponíveis comercialmente é possível citar MitoTracker Red CMXRos, o qual penetra na matriz mitocondrial, por meio da força motriz de prótons e marca a mitocôndria metabolicamente ativa em células viáveis, com emissão de fluorescência vermelha (BELENKY, CAMACHO e COLLINS, 2013; SUN et al., 2009). Bem como o BODIPY 493/503 (4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentametil-4-boro-3a,4a-diaza-s-indaceno), que é um fluorocromo lipofílico, capaz de corar tanto células vivas, quanto fixadas sendo comumente empregado por ser de fácil utilização e por seu custo relativamente baixo (HARRIS, SKINNER e WOLINS, 2013).

## 2.8 Ensaios de toxicidade

Existe uma preocupação crescente em se reduzir o uso de animais em testes de fármacos, substituindo-os por ensaios *in vitro*. No país, a implementação da Portaria Normativa número (nº) 18, de 24 de setembro de 2014, determinou que, as instituições que realizassem pesquisas com animais teriam prazo máximo de 5 anos para realizar a substituição por metodologias alternativas, quando cabíveis. Desde que essas metodologias fossem validadas e reconhecidas internacionalmente (AZEVEDO et al., 2015).

Dentre os métodos alternativos, é possível destacar os ensaios de citotoxicidade, os quais visam avaliar os efeitos dos agentes sobre funções celulares basais, como primeiro nível de testes para considerar um produto seguro (AZEVEDO et al., 2015). Fernandes e colaboradores (2013) destacaram que há vários métodos para se estudar a viabilidade celular em cultura de células. Esses ensaios de citotoxicidade são realizados em microplacas, o que possibilita analisar diferentes concentrações do composto teste. Permitem identificar tanto a proliferação quanto a morte celular, por meio de colorimetria ou absorvância, devido à incorporação de determinadas substâncias.

A utilização de metodologias *in vitro* apresenta certas vantagens, quando comparada aos ensaios *in vivo*, que seriam o baixo custo, o menor tempo de duração dos ensaios e a possibilidade de se obter resultados significativos com variáveis limitadas (MIRANDA, 2007). Nos estudos *in vitro*, a utilização de células estabelecidas ou contínuas de mamíferos, que seriam células com capacidade de se multiplicarem indefinidamente, facilitam a reprodutibilidade dos resultados (MIRANDA, 2007; SÃO PAULO, 2009).

Os fibroblastos da linhagem L 929 são células estabelecidas, provenientes de do tecido conjuntivo frouxo de camundongos, produtoras de matriz extracelular e importantes na reparação e remodelação dos tecidos. Essas células são as mais comumente utilizadas em estudos de biocompatibilidade de compostos e recomendados pela International Organization for Standardization 10993-6, em sua revisão de 1996 (LONGO, 2013; MIRANDA, 2007)

A citotoxicidade de um composto ou formulação pode ser estimada por meio da utilização do método de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT), o qual representa a indicação colorimétrica da viabilidade celular (SILVA et

al., 2015). O MTT é um composto tetrazólico de coloração amarela, que pode ser reduzido, principalmente por enzimas mitocondriais, gerando cristais de formazan, de cor púrpura (YE et al., 2013). A intensidade da densidade óptica produzida é proporcional à quantidade de células viáveis presentes na amostra (BRAGA, 2012). A captação desse composto pela célula pode se dar por meio de endocitose ou por proteínas transportadoras. A capacidade da célula em reduzir o MTT está relacionada a sua atividade mitocondrial, representando, conseqüentemente, a viabilidade celular (YE et al., 2013). Essa viabilidade celular pode ser estudada empregando-se os fibroblastos (LONGO, 2013).

Por outro lado, os ensaios ecotoxicológicos também se fazem importantes já que o crescimento da população e o avanço de novas tecnologias propiciaram o desenvolvimento e produção de novos fármacos em larga escala. A grande utilização dessas substâncias pode possibilitar a presença de resíduos dos mesmos em águas de abastecimento, superficiais e sedimentos (YAMAMOTO et al., 2012). De acordo com Yamamoto e colaboradores (2012), a ocorrência de produtos farmacêuticos no ambiente aquático torna necessária a avaliação dos possíveis efeitos adversos sobre a biota. Para isso, os ensaios de ecotoxicidade são importantes aliados na avaliação dos efeitos biológicos provocados por efluentes industriais e domésticos, por amostras ambientais e substâncias químicas, dentre elas os medicamentos. Por meio desses testes, é possível elucidar os efeitos e os mecanismos de ação dos contaminantes nos sistemas biológicos.

Cumprido ressaltar que entidades como a *Commission of the European Communities* (CEC) preconizaram que o risco ambiental deverá ser avaliado para novas substâncias, ativos químicos, compostos de interesse em produtos biocidas e substâncias já conhecidas, que requeiram prioridade, nos ambientes aquático, terrestre, aéreo e marinho. Embora, para o ambiente terrestre, os ensaios podem ser somente qualitativos, uma vez que não existe padronização dos testes (CEC, 1996).

Faz-se necessário considerar que os organismos podem ser expostos no ambiente natural, a concentrações de toxicantes insuficientes para causar a mortalidade em curto prazo. No entanto, em longo prazo, podem ocorrer alterações respiratórias, nutricionais e/ou reprodutivas (RAVANELI, 2009). Também deve ser considerada a biomagnificação, ou seja, o aumento na concentração de uma determinada substância a cada nível da cadeia alimentar. Tal processo ocorre em função de a fonte de alimento para organismos de um nível superior, incluindo os

seres humanos, ser progressivamente mais concentrada, aumentando assim a bioacumulação no topo dessa cadeia (MARCONE, 2011). Nesse aspecto, o impacto ambiental pode ter reflexos diretos na saúde humana (MAGALHÃES e FERRÃO FILHO, 2008; CAMPOS e SEO, 2009; MARCONE, 2011).

De acordo com Ravaneli (2009), os testes de toxicidade aquática são mecanismos utilizados na detecção e avaliação dos efeitos toxicológicos potenciais de produtos químicos nos organismos aquáticos. Assim, esses testes são capazes de embasar a análise do risco associado à situação na qual o agente químico, o organismo e as condições de exposição são definidos. Tal fato se justifica porque, por meio dos bioensaios, os organismos aquáticos respondem integralmente à presença ou ao efeito de uma substância tóxica, sozinha ou em associação.

Já no Brasil, os testes ecotoxicológicos têm se tornado cada vez mais comuns. Além disso, são requisitos para a obtenção e manutenção de licenças junto aos órgãos ambientais de alguns estados como a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) e Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) (MAGALHÃES e FERRÃO FILHO, 2008). Além da CETESB e ABNT, o Instituto Brasileiro de Meio ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) participou do estabelecimento de procedimentos para execução de ensaios ecotoxicológicos com organismos aquáticos (BASILE, 2008).

Os testes de toxicidade aguda com peixes e dafinídeos são considerados os principais métodos para controle ambiental, com destaque para *Daphnia magna* (MAGALHÃES e FERRÃO FILHO, 2008) e *Brachydanio rerio* ou *Danio rerio*, também conhecido como peixe paulistinha (*zebrafish* em inglês). David et al. (2012) afirmaram que os testes utilizando o microcrustáceo *Daphnia magna* são bastante utilizados, de acordo com as diretrizes internacionais. Além disso, *Danio rerio* é uma espécie modelo bem caracterizada, principalmente nas áreas de biologia do desenvolvimento e genética molecular. Além disso, embriões e larvas desse animal podem ser utilizados como modelo em testes de toxicidade, triagem ecotoxicológica e testes de medicamentos (DAVID et al., 2012).

Esses bioindicadores permitem avaliar os efeitos de substâncias tóxicas, as quais podem ser lançadas no ecossistema aquático, bem como podem ser empregados em teste de eficácia de medicamentos, para avaliar a ação desses compostos no ambiente (RAVANELI, 2009). São organismos capazes de apresentar alguma alteração, que pode ser fisiológica, morfológica ou comportamental, quando

expostos a determinados compostos. Isso ocorre devido ao baixo limite de tolerância ecológica e a resposta aguda a ser verificada pode ser a letalidade ou imobilidade de invertebrados (MOUTINHO, 2013). Vale informar que *Danio rerio* possui 89 genes relacionados ao citocromo P450 (genes CYP) já identificados; sendo 42 membros da família CYP 2 (DAVID et al., 2012).

O objetivo dos ensaios é a determinação da Concentração Letal Mediana (CL<sub>50</sub>) ou a Concentração Efetiva Mediana (CE<sub>50</sub>), que, por definição, são a concentração do agente tóxico capaz de provocar a morte ou imobilidade, respectivamente, a 50 % dos organismos avaliados, após um determinado tempo de exposição (ABNT, 2002; 2011).

De acordo com a CEC (1996), para novas substâncias deverão ser realizados, como requisitos mínimos na avaliação do risco ambiental, os teste com peixes, dafinídeos e algas. No entanto, os testes ecotoxicológicos também podem ser realizados com minhocas ou fungos (BASILE, 2008). Os ensaios podem ser do tipo estático, sem renovação da solução-teste ou semiestático, onde essa renovação é realizada (ABNT, 2011). Os requisitos para realização dos ensaios com *D. rerio* e *D. magna* podem ser verificados nos Quadros 4 e 5.

Quadro 4: Resumo dos requisitos para o ensaio definitivo de toxicidade aguda com *Danio rerio*.

<b>Requisito</b>	<b>Espécie – <i>Danio rerio</i></b>
Ensaio	Estático: 48 h
	Semiestático: 96 h
Organismo-teste	Organismo adulto com comprimento total de 2,00 cm ± 1,00 cm.
Número mínimo de soluções-testes	Cinco, mais o controle
Número mínimo de organismos por réplica	Dez
Alimentação	Nenhuma
Temperatura	23 °C a 27 °C
Fotoperíodo	12 h a 16 h de luz

Fonte: ABNT, 2011.

Quadro 5: Resumo dos requisitos para o ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia magna*.

<b>Requisito</b>	<b>Espécie – <i>Daphnia magna</i></b>
Ensaio	Estático
Idade do organismo-teste	Jovens com idade entre 2 h e 26 h
Substância de referência para sensibilidade	Dicromato de potássio
Faixa de sensibilidade ao dicromato de potássio	0,6 mg/L a 1,7 mg/L
Número de concentrações	Mínimo de cinco, além do controle
Número de organismos por concentração	Mínimo de vinte
Temperatura	18 °C a 22 °C
Efeito observado	Imobilidade

Fonte: ABNT, 2002.

Embora não exista um consenso na legislação brasileira sobre a padronização dos métodos de biomonitoramento, a percepção de que a condição da água pode ser avaliada por meio de informações sobre organismos aquáticos impactou na normatização do país (BUSS, OLIVEIRA e BAPTISTA, 2008).

Magalhães e Ferrão Filho (2008) afirmaram que a legislação ambiental com foco nas análises ecotoxicológicas estava em estágio de construção. Em 17 de março de 2005, foi promulgada, pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), a Resolução nº 357, que incorporou ao seu texto a necessidade de que substâncias ainda não listadas nessa Resolução e passíveis de causar danos aos seres vivos fossem investigadas por meio de ensaios ecotoxicológicos, toxicológicos ou outro método reconhecido (BRASIL, 2005).

Em 2011, a Resolução nº 430, veio alterar o artigo 3º da Resolução 357/2005, estabelecendo que os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderiam ser lançados diretamente nos corpos receptores após o tratamento correto e atendimento aos requisitos previstos na Seção II da mesma norma (SILVA, 2011). A norma citada também ratificou a necessidade de realização dos ensaios ecotoxicológicos, em organismos aquáticos de pelo menos dois níveis tróficos diferentes (BRASIL, 2011).

Por fim, a agência ambiental já reconheceu a necessidade e importância da realização de tais ensaios. Cabe à ANVISA adequar suas normativas, que dispõem sobre boas práticas de fabricação e registro de medicamentos e insumos para que também incluam esse requisito em seus textos.

## **2.9 Inovação**

A inovação é considerada um processo complexo, que se baseia na transformação do conhecimento científico em bens e produtos (BARREIRO e PINTO, 2013). Queiroz, Albuquerque e Malink (2013) reconheceram a classificação apresentada por Knight em 1967, na qual a inovação pode se dividir em quatro tipos, que seriam: a inovação no produto ou no serviço; no processo de produção; na estrutura organizacional ou nas pessoas envolvidas num processo de trabalho.

O Brasil tem avançado na área de pesquisa e desenvolvimento de medicamentos e, dentre outros aspectos que contribuíram para esse avanço é possível destacar a aprovação da lei de patentes, o surgimento de unidades qualificadas de pesquisa clínica e aprovação da Lei da Inovação. Além da criação da ANVISA, surgimento dos medicamentos genéricos, criação da política industrial tecnológica e de comércio exterior e a interação universidade e empresa, com a inserção de doutores no setor industrial (CALIXTO e SIQUEIRA JR., 2008).

Além disso, foi promulgada no país, em 02 de dezembro de 2004, a Lei 10.973, que ficou conhecida como Lei da Inovação. O objetivo principal dessa norma foi regulamentar a transferência de tecnologia entre universidades e empresas. Assim, cada instituição pública de ensino e pesquisa deveria criar um Núcleo de Inovação Tecnológica, capaz de promover a articulação academia-empresa (PINTO, GALEMBECK e ANDRADE, 2010; FONSECA, CLEMENTE e OLIVEIRA, 2012).

Cerca de 75 % dos medicamentos utilizados pela indústria farmacêutica são derivados de plantas, as quais já eram utilizadas pelas comunidades indígenas. O maior potencial econômico da biodiversidade associa-se ao descobrimento de novos princípios ativos a partir dessa biodiversidade ou pela síntese, utilizando-se recursos biológicos (TAKAKI, MODESTO JR. e FIGUEIREDO, 2007).

Até 2007, 365000 espécies de plantas haviam sido classificadas, porém apenas 1100 tiveram suas propriedades medicinais analisadas. Do total de espécies classificadas, 8 % eram como possuidoras de compostos bioativos e 25000 foram

utilizadas na medicina tradicional (TAKAKI, MODESTO JR. e FIGUEIREDO, 2007). O conhecimento tradicional do uso de algumas plantas eleva em 400 % as chances de geração de um produto tecnológico e tem sido utilizado como meio de reduzir os gastos com bioprospecção (TAKAKI, MODESTO JR. e FIGUEIREDO, 2007).

O desenvolvimento de um produto inovador a partir da identificação de uma molécula bioativa até seu lançamento no mercado é um processo elaborado, demorado e custoso (CALDERON, SILVA e STÁBELI, 2010). Segundo Torres (2009), requer entre 10 e 15 anos e investimentos de cerca de U\$ 300,00 milhões. Pereira, M. (2009) afirmou que a bioprospecção pode reduzir o tempo e o custo de produção de um novo fármaco e os valores de produção podem ser reduzidos a aproximadamente U\$ 70,00 milhões. Além disso, possibilita o desenvolvimento de medicamentos mais eficientes, com menos efeitos colaterais e maior facilidade de uso.

Dados apontaram que tanto a biotecnologia clássica quanto a moderna têm por objetivo o desenvolvimento de produtos, processos ou serviços. Nesse sentido, essa ciência buscava associar produtos biológicos inovadores, oriundos de recursos naturais, à conservação da biodiversidade e o desenvolvimento econômico (PEREIRA, M., 2009).

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Geral

Avaliar a atividade antifúngica de cinamaldeído, eugenol e  $\alpha$ -metil-*trans*-cinamaldeído e desenvolver uma formulação com ação sobre os principais fungos causadores da onicomicose com o composto ou associação mais eficaz.

### 3.2 Específicos

- Verificar a atividade antifúngica e estabelecer a CIM a CFM dos compostos cinamaldeído, eugenol e  $\alpha$ -metil-*trans*-cinamaldeído e da associação cinamaldeído/eugenol.
- Selecionar o composto ou associação mais eficaz frente aos micro-organismos testados.
- Avaliar, morfológicamente, as estruturas fúngicas antes e após os tratamentos com os fármacos de referência e composto mais eficaz por meio de MEV.
- Avaliar a interferência com a atividade de fosfolipase em *C. albicans* do composto mais eficaz.
- Avaliar a toxicidade aguda do composto mais ativo, por meio de ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia magna*.
- Verificar o percentual de viabilidade celular em fibroblastos murinos L 929, após o tratamento com o composto mais eficaz pelo método de MTT.
- Avaliar, por meio de citometria de fluxo, a atividade mitocondrial e o percentual de lipídios neutros nas células de *F. oxysporum* após o tratamento com o composto mais ativo, com a utilização de sondas fluorescentes.
- Desenvolver uma formulação tópica com o composto ou associação cinamaldeído/eugenol mais eficaz e realizar teste *in vitro* com essa formulação.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Linhagens fúngicas de interesse

Os fungos filamentosos *T. mentagrophytes* ATCC 11481, *T. rubrum* URM 1666, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ATCC 48112, *F. solani* ATCC 36031, *M. canis* ATCC 32903, *M. gypseum* ATCC 14683 e *E. floccosum* CCF-IOC-3757 foram conservados em água purificada, conforme estabelecido por Rodrigues, Lírio e Lacaz (1992). Todos os fungos foram obtidos do Laboratório de Micro-organismos de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, exceto *T. rubrum* e *E. floccosum*, os quais foram obtidos da Fundação André Tosello. A levedura *C. albicans* ATCC 10231 (CCT 776), também proveniente da Fundação André Tosello, foi conservada em meio *skin milk* a – 20 °C. Além disso, foram utilizados dois isolados clínicos, *T. mentagrophytes* e *C. albicans*, provenientes do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Os fungos filamentosos foram submetidos à microcultivo em ágar batata dextrose, para confirmação da pureza das linhagens, enquanto a levedura foi avaliada diretamente ao microscópio, após o cultivo, com auxílio do corante lactofenol azul de algodão.

### 4.2 Compostos analisados

Os compostos cinamaldeído (*Sigma Aldrich Chemistry*, EUA), eugenol (*Sigma Aldrich Chemistry*, EUA) e  $\alpha$ -metil-*trans*-cinamaldeído (*Sigma Aldrich Chemistry*, EUA) foram utilizados nas análises.

### 4.3 Avaliação da atividade antifúngica

#### 4.3.1 Ensaio preliminar

Essa metodologia de triagem seguiu os procedimentos adotados por Souza e colaboradores (2002). A solução estoque (SE) dos compostos foi preparada em salina estéril 0,9 % (p/v) (Vetec, Brasil), de forma a se obter concentração final de

1000 µg/mL dos compostos e associações cinamaldeído/eugenol (75 % / 25 %; 50 % / 50 % e 25 % / 75 %) no meio de cultura *Sabouraud* dextrose ágar (SDA) (Himedia, Índia) com cloranfenicol 0,05 % (p/v) (*Sigma Aldrich Chemistry*, EUA).

Para a solubilização dos compostos, foi adicionado volume de *Tween* 80 (Vetec, Brasil)/Dimetilsulfóxido (DMSO) (*Sigma Aldrich*, EUA) (1:1, v/v) correspondente a 83 % do volume adicionado do composto em análise. A solução final foi homogeneizada em vórtex (*Genie 2, Scientific Industries*, EUA), por cerca de 30 segundos.

Foi utilizada no ensaio placa estéril de fundo chato e com 24 poços de polipropileno (*Sarstedt*, Alemanha). A cada poço, foram adicionados 100 µL de SE e 1900 µL de SDA com cloranfenicol 0,05 % (p/v) em temperatura aproximada de 45 °C. Após a completa homogeneização e solidificação do meio de cultura, foi acrescentado o fragmento de cerca de 2 mm de extensão da cada linhagem de fungo filamentosos.

O controle de esterilidade foi preparado como descrito para a amostra, sem a adição do micro-organismo. O controle de viabilidade foi preparado pela adição de *Tween* 80/DMSO (1:1 v/v), solução salina estéril 0,9 % (p/v), SDA com cloranfenicol 0,05 % e o fragmento fúngico.

As placas foram incubadas a 25 °C por 7 dias e, após esse período, foi considerada provável atividade antifúngica, a inibição total do crescimento desses micro-organismos.

#### **4.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima e da concentração fungicida mínima**

##### **4.3.2.1 Fungos filamentosos dermatófitos**

A metodologia para a determinação da CIM de fungos filamentosos foi realizada conforme estabelecido pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) em seus protocolos M38-A e M38-A2 para o ensaio com fungos dermatófitos (CLSI, 2002b; 2008) e o valor de transmitância e o comprimento de onda fixo seguiram o estabelecido por Almeida e colaboradores (2009).

No preparo da suspensão fúngica, foram utilizadas culturas com 7 dias de crescimento, as quais foram rinsadas com 2 mL de solução salina estéril 0,85 %

(p/v) e 0,02 mL de *Tween 20*. Procedeu-se a mais 3 lavagens sequenciais, apenas com solução salina estéril 0,85 % (p/v). Os líquidos de lavagem foram recolhidos e homogeneizados em vórtex por 1 minuto. Após sedimentação das partículas mais pesadas, o sobrenadante foi transferido para outro frasco estéril e homogeneizado, em vórtex, por 15 segundos (CLSI, 2008).

A transmitância dessa última suspensão foi ajustada para 68-70 %, em comprimento de onda fixo de 530 nm (ALMEIDA et al., 2009). Essa suspensão, diluída à razão de 1 : 50 em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (*Sigma Aldrich Chemistry*, EUA) tamponado com ácido 3 (N-morfolino) propanosulfônico (MOPS) (J. T. Baker, Alemanha) ( $\text{pH} = 7,0 \pm 0,2$ ), correspondia a 2 vezes o inóculo de  $0,4 \times 10^4$  a  $5 \times 10^4$  unidades formadoras de colônia (UFC)/mL necessário ao teste (CLSI, 2002b).

Foram preparadas diluições dos fármacos terbinafina (Gemini, Brasil), cetoconazol (Attivos Magistrais, Brasil) e itraconazol (*Sigma Aldrich Chemistry*, EUA) nas concentrações de 480 a 0,03  $\mu\text{g/mL}$ , 640 a 0,03  $\mu\text{g/mL}$  e 64 a 0,03  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Esses fármacos foram, inicialmente, diluídos em DMSO e, a seguir, em meio RPMI-1640 tamponado com MOPS, à razão de 1 : 50.

Os compostos e as associações cinamaldeído/eugenol foram analisados nas concentrações de 1000  $\mu\text{g/mL}$  a 0,12  $\mu\text{g/mL}$ . Para sua solubilização foram adicionados *Tween 80/DMSO* (1 : 1, v/v), na proporção de 83 % do volume adicionado do composto teste. As diluições foram preparadas em meio RPMI-1640 tamponado com MOPS (ALMEIDA et al., 2009; CLSI, 2002b).

Foram utilizadas placas de microtitulação estéreis de polipropileno, fundo chato e 96 poços (*Sarstedt*, Alemanha) e todas as análises foram realizadas em triplicata.

Os controles de esterilidade para os fármacos de referência e compostos foram diluídos em meio RPMI-1640 não inoculado e os controles de viabilidade foram diluídos em meio RPMI-1640 inoculado, a fim de se verificar a interferência de DMSO, *Tween 20* ou *Tween 80/DMSO* (1 : 1, v/v) na viabilidade fúngica.

Para os fármacos de referência ou composto e associações, foi transferida uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  de cada diluição para o poço da microplaca, seguida pela adição de 100  $\mu\text{L}$  de meio RPMI-1640 inoculado. Após esses procedimentos, a microplaca foi homogeneizada em agitador de microplacas (*Microplate*, *Scientific Industries*, EUA), durante 2 minutos e incubada a 25 °C por 7 dias.

A CIM foi a menor concentração de um agente antifúngico capaz de inibir, substancialmente, o crescimento visualmente detectado do micro-organismo (CLSI, 2002b). A partir da CIM, foram retiradas alíquotas de 10,00 µL dos poços nos quais não houve crescimento visível e transferidas para poços contendo 200 µL de *Sabouraud dextrose broth* (SDB). Dessa forma, havendo crescimento, ao se diluir o agente antifúngico, era possível concluir que o efeito do agente era fungistático ou, não existindo desenvolvimento de micro-organismo, o efeito era fungicida (PEREIRA O., 2009; PEREIRA O. et al., 2011).

As placas foram agitadas em agitador de microplacas por 2 minutos e incubadas a 25 °C por 7 a 10 dias. A CFM foi a menor concentração da substância teste na qual a linhagem fúngica não apresentou capacidade de crescimento, quando inoculada em meio sem antifúngicos (PEREIRA, O., 2009).

Para os fármacos de referência, os micro-organismos foram classificados em sensíveis, quando  $MIC \leq 1 \mu\text{g/mL}$ ; de sensibilidade intermediária, quando  $MIC = 2 \mu\text{g/mL}$  ou resistentes aos fármacos, quando  $MIC \geq 4 \mu\text{g/mL}$ , de acordo com a classificação estabelecida pelo CLSI (2008).

#### 4.3.2.2 Fungos filamentosos não dermatófitos

De acordo com o CLSI (2008), as colônias dos fungos *F. oxysporum* e *F. solani* foram mantidas em ágar batata dextrose a 35 °C por 2 dias e a 25 °C até completar o 7<sup>o</sup> dia. Após esse período, foi preparada suspensão fúngica em salina a 0,85 %, comprimento de onda de 530 nm e densidade ótica entre 0,15 e 0,17. A suspensão foi diluída à razão de 1 : 50 (v/v) em RPMI 1640 tamponado com MOPS (pH = 7,0 ± 0,2), a fim de se obter inóculo entre  $0,4 \times 10^4$  a  $5 \times 10^4$  UFC/mL. Os compostos, as associações e os fármacos de referência foram diluídos e as microplacas de 96 poços foram preparadas como descrito para os fungos filamentosos dermatófitos. A incubação foi realizada a 35 °C por 2 dias e a CIM e a CFM avaliadas como descrito anteriormente (CLSI, 2008).

#### 4.3.2.3 Leveduras

Os procedimentos foram realizados conforme Protocolo M27-A2 do CLSI (CLSI, 2002a). A suspensão fúngica foi preparada com salina estéril (NaCl 0,85 %

p/v), utilizando espectrofotômetro Libra S12 (Biochrom, Dinamarca) e comprimento de onda fixo de 530 nm. Essa suspensão foi então diluída em meio de cultura RPMI 1640, tamponado com MOPS e o pH foi ajustado a pH  $7,0 \pm 0,1$ , de modo a se obter entre  $5 \times 10^2$  a  $2,5 \times 10^3$  células/mL. Os compostos foram diluídos em RPMI 1640 tamponado com MOPS e 20  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de Tween 80/Dimetilsulfóxido (DMSO) (1 : 1, v/v) na faixa de concentração de 2,44 a 5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . O ensaio foi realizado em microplacas estéreis de 96 poços (Sarstedt, Alemanha), aos quais foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  das diluições dos compostos e 100  $\mu\text{L}$  de RPMI 1640, tamponado com MOPS e inoculado com o número de unidades formadoras de colônia adequados do micro-organismo. O controle de crescimento consistiu-se de 100  $\mu\text{L}$  do mesmo meio de cultura inoculado e 20  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de Tween 80/Dimetilsulfóxido (DMSO) (1 : 1, v/v) e quantidade suficiente de meio não inoculado para perfazer 200  $\mu\text{L}$ . O controle negativo foi preparado pela adição de 200  $\mu\text{L}$  de meio não inoculado. O fármaco Anfotericina B (Cristália, Brasil) foi utilizado como controle positivo nas concentrações de 0,03 a 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . As microplacas foram incubadas a 35 °C/48 h. A concentração inibitória mínima (CIM) foi estabelecida como a menor concentração na qual não foi verificada presença de turvação do meio de cultura. Após a verificação da CIM, uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  foi retirada dos poços onde não houve crescimento visível e reincubada com 4 mL de *Tryptic Soy Broth* (TSB) sem adição de antifúngico, por mais 48 h a 35 °C. A menor concentração na qual não se verificou a presença de turbidez após esse período, foi considerada a CFM. Os resultados obtidos foram expressos em  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

#### 4.3.3 Classificação da associação de compostos quanto ao efeito

A associação entre os compostos cinamaldeído e eugenol foi avaliada por meio do índice de concentração inibitória fracional (CIF), conforme estabelecido por Pei e colaboradores em 2009 e foi considerada:

- sinérgica: índice CIF < 1
- aditiva: índice CIF = 1
- indiferente:  $1 < \text{índice CIF} < 2$
- antagônica: índice CIF > 2

O índice CIF é dado pela soma do CIF de cada composto (CIM do componente em associação/CIM do composto isoladamente).

#### 4.3.4 Microscopia eletrônica de varredura

##### 4.3.4.1 Ensaio com fungos filamentosos

Na MEV, foram avaliadas as alterações morfológicas ocasionadas nos micro-organismos não submetidos a qualquer tratamento e nos fungos submetidos a tratamento farmacológico com os fármacos de referência e composto ou associação. O composto mais eficaz foi selecionado a partir dos ensaios preliminar e de determinação da CIM e da CFM e utilizada metade da CIM na MEV, tanto para o composto, quanto para os fármacos de referência.

A suspensão fúngica foi preparada como descrito no ensaio para determinação da CIM, diluída em meio RPMI tamponado com MOPS e pH ajustado para  $7,0 \pm 0,2$  na razão de 1 : 50. Para os fungos não submetidos a tratamento farmacológico, foi utilizada a suspensão diluída no meio de cultura e meio isento de micro-organismo (1 : 1, v/v). Os tratamentos foram preparados com a suspensão fúngica diluída e os fármacos ou composto/associação também diluídos no meio de cultura (1 : 1, v/v). As placas foram então incubadas a 25 °C por 7 dias para fungos dermatófitos e por 2 dias, a 35 °C, para fungos não dermatófitos. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 1310 x g, o sobrenadante desprezado e os *pellets* recolhidos e lavados três vezes em tampão fosfato pH 7,2. Após esse procedimento, procedeu-se conforme descrito a seguir:

a) Fixação com a utilização de solução de *Karnovsky* (glutaraldeído 2,5 % [*Sigma Aldrich Chemistry*, EUA] , paraformaldeído 2,5 % [*Sigma Aldrich Chemistry*, EUA] em tampão cacodilato de sódio 0,05 M [*Sigma Aldrich Chemistry*, EUA], cloreto de cálcio 0,001 M [Vetec, Brasil], pH 7,2): a amostra ficou submersa nesta solução por 24 h na geladeira e, após este período, o fixador foi removido e as amostras foram lavadas com tampão cacodilato 0,05 M pH 7,2; por 3 vezes.

b) Adesão em lamínulas de vidro circular 13 mm, contendo poli-d-lisina 0,1 % em água (*Sigma Aldrich Chemistry*, EUA).

c) Pós-fixação com solução de OsO<sub>4</sub> a 1 % (*Sigma Aldrich Chemistry*, EUA): as amostras, após serem submetidas ao tratamento descrito, foram então imersas, por 1 hora, em solução de OsO<sub>4</sub> a 1 %, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

d) Desidratação com concentrações crescentes de etanol: após o procedimento anterior, as amostras foram lavadas com tampão fosfato pH 7,2 e dessecadas em concentrações crescentes de solução de etanol Pró Análise (7,5 %, 15 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90 % e 99,6 %), nas quais permaneciam por 5 (concentração de 7,5 %) ou 15 minutos (demais concentrações).

e) Ponto crítico: as amostras foram submetidas ao ponto crítico, (Leica EM CPD 030, Alemanha)

d) metalização e análise: as lamínulas foram fixadas sobre *stubs* de alumínio, com auxílio de fita de carbono dupla face receberam banho de vapor de ouro em metalizador (Balzer FL-9496, Liechtenstein) e foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM 6390LV), operando a uma voltagem de 15 Kv e distância de trabalho de 17 mm. A realização do ponto crítico, metalização e microscopia foram realizados no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

#### 4.3.4.2 Ensaio com levedura

O material utilizado para observação por MEV foi composto por colônias de *C. albicans* não submetidas a tratamento farmacológico e colônias expostas à anfotericina B e ao composto ou associação selecionado a partir dos ensaios preliminar e de determinação da CIM e da CFM.

O preparo das amostras foi realizado conforme método descrito no ensaio para a determinação da CIM. Foram transferidos, para a microplaca, 100 µL de caldo inoculado com a levedura e 100,00 µL do meio isento de micro-organismo para a avaliação da levedura não submetida ao tratamento farmacológico. Os tratamentos foram obtidos pela adição de 100,00 µL de caldo inoculado com a levedura e 100 µL do meio contendo o fármaco ou composto/associação na concentração de 1/2 CIM. As placas foram incubadas a 35 °C por 48 h e, após esse período, as amostras

foram, então, centrifugadas 2655 x g por 10 minutos (Eppendorf, 5417R, Alemanha) e os *pellets* foram transferidos para lamínulas de vidro, contendo poli-d-lisina 0,1 % em água (*Sigma Aldrich Chemistry*, EUA).

Após esse procedimento, procedeu-se conforme descrito a seguir:

Fixação com a utilização de solução de glutaraldeído (*Sigma Aldrich Chemistry*, EUA) 2,5 % por 12 h. Após este período, as lamínulas foram lavadas com tampão fosfato 0,1 M pH = 7,4 e desidratadas com concentrações crescentes de etanol (50 % a 100 %), com intervalo de 20 minutos entre cada troca. Em seguida, as lamínulas foram secas à temperatura ambiente e colocadas sobre *stubs*, com fita de carbono dupla face. Posteriormente, as lamínulas foram submetidas ao ponto crítico, à metalização e à análise ao microscópio eletrônico nos mesmos equipamentos e condições de análise dos fungos filamentosos.

#### **4.4 Avaliação da atividade de fosfolipase em *C. albicans***

O meio para o ensaio da fosfolipase foi preparado pela adição de 11,70 g de NaCl, 0,11 g de CaCl<sub>2</sub> e 13,00 g de ágar SDA à 200 mL de água destilada. Após o processo de esterilização, adicionou-se 10 % de suspensão de gema de ovo (MAHMOUDABADI, ZARRIN e MIRY, 2010; MUHSIN, AUBAID e AL-DUBOON, 1997; PAKSHIR et al., 2013; RAMOS et al., 2015).

A suspensão fúngica foi preparada como descrito no ensaio para a determinação da CIM. Após a solidificação do meio de cultura, cerca de 10 µL da suspensão foi inoculada nesse meio e as placas foram incubadas a 35 °C por 5 a 7 dias.

A levedura foi avaliada no meio de cultura isento de qualquer antifúngico, a fim de verificar se a mesma era produtora de fosfolipase. Após a confirmação de tratar-se de uma espécie produtora dessa enzima, foi avaliada a capacidade do composto ou associação em interferir nessa produção. Para isso, o mesmo foi incorporado ao meio de cultura antes de sua solidificação, em concentração correspondente à metade da CIM.

A relação Pz, que correspondia à relação entre o diâmetro da colônia e o diâmetro total do halo formado, foi avaliada em função do percentual de alteração em comparação com o controle, conforme descrito por Shreaz e colaboradores (2012).

De acordo com Pereira A. e colaboradores (2011), a atividade de fosfolipase pode ser classificada em: ausência de atividade ( $Pz = 1$ ); atividade moderada ( $0,64 \geq Pz < 1$ ) ou atividade forte ( $Pz < 0,64$ ).

#### 4.5 Citometria de fluxo

Esse ensaio foi realizado no Laboratório de Fisiologia de Fungos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, para o fungo *F. oxysporum* ATCC 48112. O fungo foi cultivado por 48 h (à 35 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>, protegido da luz, em câmara úmida) em meio RPMI 1640 suplementado com 2 % de glicose (pH 7,2, tamponado com MOPS), com ou sem anfotericina B (0,125 µg/mL) ou composto mais eficaz (0,25 µg/mL).

Após esse período, os conídios foram filtrados, lavados duas vezes em salina 0,9 %, contados em câmara de Neubauer e ajustados à concentração de 10<sup>6</sup> conídios/mL, em criotubos contendo 100 µL de suspensão fúngica. Essa suspensão foi centrifugada (3000 rotações por minuto por 3 minutos) e o sobrenadante desprezado. Os conídios foram incubados com 50 µM de BODIPY 493/503 (Molecular Probes™) ou com 40 µM de MitoTracker Red CMXRos (Molecular Probes™), por 30 minutos à temperatura ambiente, protegidos da luz.

Após a incubação com os respectivos marcadores, os conídios foram lavados com salina 0,9 %, fixados com 2 % de paraformaldeído (por 40 minutos, à temperatura ambiente, protegidos da luz), lavados novamente com salina 0,9 %, ressuspendidos em 100 µL de salina 0,9 % e cada amostra foi transferida para uma placa de 96 poços escura. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo (BD Accuri C6, EUA), utilizando os filtros FL1 (BODIPY 493/503) e FL2 (MitoTracker Red CMXRos) e os dados foram analisados pelo BD Accuri C6 Software.

#### 4.6 Ensaios de toxicidade

##### 4.6.1 Ensaio de verificação da viabilidade celular pelo método de MTT

Foram utilizados, nesse ensaio, fibroblastos murinos (L 929), os quais foram cultivados em meio *Eagle* modificado por Dulbecco (DMEM) (Nutricell, Brasil) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (Invitrogen, EUA), 100 U/mL de

penicilina, 100 U/mL de estreptomicina, tampão *HEPES* 10 mM e mantidos a 37 °C numa atmosfera úmida de ar e CO<sub>2</sub> a 5 % e pH 7,4.

Os fibroblastos de camundongo foram semeados em placas estéreis, de polipropileno, fundo chato e 96 poços (*Sarstedt*, Alemanha) na densidade de 5 x 10<sup>4</sup> células por poço. Após 48 h de incubação, o meio de cultura foi substituído pelo composto ou associação mais promissor(a). Foram preparados os controles contendo os diluentes DMSO ou *Tween* 80/DMSO (1 : 1, v/v) na concentração máxima utilizada para o composto, respectivamente, além de um controle sem adição de qualquer tratamento. As placas foram incubadas a 37 °C em 5 % de CO<sub>2</sub> por 48 h.

Após esse período, o meio foi removido e foram adicionados 10 % de MTT (5 mg/mL) em DMEM, 200 µL por poço, e a placa foi reincubada por 3 h a 37 °C. O precipitado produzido foi então dissolvido em DMSO e a absorvância foi medida a 570 nm, utilizando um leitor de microplacas (Thermo Scientific Multiskan Go, Finlândia) (MOSMANN, 1983).

A taxa de viabilidade celular pode ser determinada pela seguinte Equação 1:

$$\text{Equação 1: \% Viabilidade celular} = \frac{\text{absorvância das células submetidas ao tratamento}}{\text{absorvância das células não submetidas ao tratamento}} \times 100$$

Os dados obtidos foram avaliados estatisticamente por análise de variância, seguida por teste *post hoc* de Bonferroni, com auxílio do *software Graphpad Prism* versão 6. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0.05$ . A regressão linear, para obtenção da equação da reta, foi desenvolvida com o *software Microsoft Excel* 2007.

#### 4.6.2 Ensaio com *D. magna*

Para a realização do ensaio de toxicidade aguda, foi utilizado o *Kit Daphtoxkit F magna* (Microbio Tests Inc., Bélgica). Foram utilizados organismos com 2 a 26 h de vida após a eclosão dos ovos e todos os procedimentos realizados seguiram as orientações do fabricante, contidas no *kit*.

Nesse ensaio, foram avaliadas 5 concentrações do composto teste, na faixa de 0,1 a 40 mg/mL, com auxílio de *Tween* 80/DMSO (1:1, v/v). Foram preparados também os controles, os quais consistiam de *Tween* 80/DMSO (1 : 1, v/v) na mesma

concentração utilizada para a diluição e somente a água padrão disponível para preparado nesse *kit*. A cada concentração foram acrescentados 25 microcrustáceos, os experimentos foram protegidos da luz, incubados por 48 h a 22 °C e os resultados expressos em CE<sub>50</sub> (ABNT, 2002).

O composto avaliado foi categorizado conforme o estabelecido por Zucker (1985) *apud* Manrique (2009), de acordo com Tabela 1.

Tabela 1: Classificação da toxicidade aguda para organismos aquáticos.

<b>Classe de toxicidade</b>	<b>CL<sub>50</sub> ou CE<sub>50</sub> (mg/L)</b>
Extremamente tóxico	< 0,10
Altamente tóxico	0,10 a 1,00
Moderadamente tóxico	> 1,00 a < 10,00
Ligeiramente tóxico	> 10,00 a < 100,00
Praticamente não tóxico	> 100,00

Fonte: MANRIQUE, 2009.

#### 4.7 Ensaio com a formulação

A formulação foi preparada pela adição dos componentes a seguir:

- Cinalmaldeído: 2 % (v/v)
- DMSO: 1 % (v/v)
- *Tween* 80: 1 % (v/v)
- Etanol para análise: 0,5 % (v/v)
- Água destilada quantidade suficiente para 30 mL

Para o preparo, o cinamaldeído foi transferido para criotubo e adicionados DMSO e *tween* 80 nas quantidades descritas acima. A mistura foi devidamente homogeneizada em vórtex e, a seguir, foi adicionado o etanol. Após a devida homogeneização, a mistura foi transferida para balão volumétrico e o volume foi completado para 30 mL.

Essa formulação foi testada frente aos fungos *T. mentagrophytes* ATCC 11481, *F. oxysporum* ATCC 48112, *M. gypseum* ATCC 14683 e *Candida albicans* ATCC 10231, utilizando-se 10 %; 1 %; 0,5 % e 0,1 % da formulação em meio SDA.

A suspensão de *C. albicans* ATCC 10231 foi padronizada, conforme estabelecido no ensaio para a determinação da CIM e diluída à razão de 1 : 50 (v/v) em meio SDA fundido, contendo a formulação. Foram utilizadas placas estéreis de 24 poços (*Sarstedt*, Alemanha) e os ensaios foram realizados em duplicata. Foi preparada uma formulação contendo somente os excipientes, para servir como controle positivo do ensaio, a qual também foi avaliada nos percentuais de 10 %; 1 %; 0,5 % e 0,1 % em SDA. As placas foram incubadas a 35 °C por 48 h e, após esse período, avaliadas quanto ao crescimento fúngico, por comparação com o controle de viabilidade fúngica, em meio isento de antifúngico.

Para os fungos filamentosos, após a solidificação do meio de cultura, foi acrescentado fragmento fúngico de cerca de 2 mm de comprimento, conforme descrito no ensaio preliminar. As placas foram incubadas a 25 °C por 5 a 7 dias, para os fungos filamentosos e a 35 °C por 48 h para a levedura e avaliadas quanto à presença de crescimento fúngico.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação da atividade antifúngica

#### 5.1.1 Ensaio Preliminar

Esse ensaio foi realizado com as linhagens de fungos filamentosos, a fim de possibilitar o conhecimento prévio do comportamento dos micro-organismos frente aos compostos teste, na concentração de 1000 µg/mL. Os compostos foram considerados como prováveis possuidores de atividade farmacológica, quando inibiram o crescimento fúngico ou inativos, nas condições experimentais, quando houve crescimento visível na placa. Os resultados podem ser verificados na Tabela 2.

Tabela 2: Ensaio preliminar com os compostos e associações frente às linhagens de fungos filamentosos.

Micro-organismo	Cinamaldeído	Eugenol	$\alpha$ -metil- <i>trans</i> -cinamaldeído	Cinamaldeído/Eugenol		
				75 %/ 25 %	50 %/ 50 %	25 %/ 75 %
<i>T. mentagrophytes</i> ATCC 11481	Ativo	Ativo	Ativo	Ativo	Ativo	Ativo
<i>F. oxysporum</i> ATCC 48112	Ativo	Inativo	Ativo	Ativo	Ativo	Ativo
<i>F. solani</i> ATCC 36031	Ativo	Inativo	Ativo	Ativo	Ativo	Ativo
<i>M. canis</i> ATCC 32903	Ativo	Ativo	Ativo	Ativo	Ativo	Ativo
<i>M. gypseum</i> ATCC 14683	Ativo	Ativo	Ativo	Ativo	Ativo	Ativo
<i>T. rubrum</i> URM 1666	Ativo	Ativo	Ativo	Ativo	Ativo	Ativo
<i>E. floccosum</i> CCF-IOC-3757	Ativo	Inativo	Inativo	Ativo	Ativo	Ativo

Com base nos resultados obtidos é possível verificar que o cinamaldeído e as associações cinamaldeído/eugenol em todas as proporções foram, provavelmente, ativos contra todas as espécies avaliadas. O  $\alpha$ -metil-*trans*-cinamaldeído e o eugenol não inibiram o crescimento de *E. floccosum* CCF-IOC-3757 nas condições experimentais e o eugenol não foi ativo frente a *F. oxysporum* ATCC 48112 e *F. solani* ATCC 36031 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ .

### **5.1.2 Determinação da concentração inibitória mínima e da concentração fungicida mínima**

Como descrito, a CIM foi avaliada por microdiluição em placa de 96 poços, utilizando-se o meio RPMI-1640 tamponado com MOPS e a terbinafina, o cetoconazol e o itraconazol como fármacos de referência. A CFM foi estimada a partir das concentrações nas quais não se observou o crescimento fúngico no ensaio da determinação da CIM. Os resultados obtidos podem ser verificados nas Tabelas 3, 4 e 5.

Tabela 3: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) dos fármacos de referência.

Resultados de CIM e CFM expressos em µg/mL. NR: Não realizado

Micro-organismos	Cetoconazol		Terbinafina		Itraconazol		Anfotericina B	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>T. mentagrophytes</i> ATCC 11481	0,25	0,25	0,03	0,03	8	64	NR	NR
<i>T. mentagrophytes</i> isolado clínico	0,5	1	0,38	3	4	32	NR	NR
<i>F. oxysporum</i> ATCC 48112	> 640	> 640	> 480	> 480	> 64	NR	NR	NR
<i>F. solani</i> ATCC 36031	> 640	> 640	160	160	> 64	NR	NR	NR
<i>M. canis</i> ATCC 32903	0,06	8	0,19	0,19	> 64	NR	NR	NR
<i>M. gypseum</i> ATCC 14683	8	16	0,12	0,12	64	> 64	NR	NR
<i>T. rubrum</i> URM 1666	1	4	0,19	0,19	> 64	NR	NR	NR
<i>E. floccosum</i> CCF-IOC-3757	> 640	> 640	> 480	> 480	> 64	NR	NR	NR
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0,13	0,5
<i>C. albicans</i> isolado clínico	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0,08	0,31

Tabela 4: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) de cinamaldeído, eugenol e  $\alpha$ -metil-*trans*-cinamaldeído.

Resultados de CIM e CFM expressos em  $\mu\text{g/mL}$

Micro-organismos	Cinamaldeído		Eugenol		$\alpha$ -metil- <i>trans</i> -cinamaldeído	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>T. mentagrophytes</i> ATCC 11481	0,49	0,49	125	500	125	500
<i>T. mentagrophytes</i> isolado clínico	15,63	62,5	125	250	500	> 1000
<i>F. oxysporum</i> ATCC 48112	15,63	15,63	62,5	125	250	250
<i>F. solani</i> ATCC 36031	15,63	15,63	250	250	250	1000
<i>M. canis</i> ATCC 32903	0,49	0,49	125	250	125	500
<i>M. gypseum</i> ATCC 14683	15,63	15,63	500	500	250	500
<i>T. rubrum</i> URM 1666	0,12	0,49	250	500	31,25	1000
<i>E. floccosum</i> CCF-IOC-3757	125	500	1000	> 1000	> 1000	> 1000
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	2,44	2,44	625	1250	312,5	1250
<i>C. albicans</i> Isolado clínico	19,53	19,53	625	625	625	1250

Tabela 5: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) de associações cinamaldeído/eugenol.

Resultados de CIM e CFM expressos em µg/mL

Micro-organismos	Cinamaldeído/Eugenol					
	75 %/25 %		50 %/50 %		25 %/75 %	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>T. mentagrophytes</i> ATCC 11481	15,63	31,25	15,63	31,25	31,25	31,25
<i>T. mentagrophytes</i> isolado clínico	31,25	62,5	31,25	125	62,5	125
<i>F. oxysporum</i> ATCC 48112	31,25	31,25	62,5	62,5	62,5	62,5
<i>F. solani</i> ATCC 36031	31,25	31,25	62,5	62,5	125	125
<i>M. canis</i> ATCC 32903	0,49	0,49	31,25	62,5	31,25	62,5
<i>M. gypseum</i> ATCC 14683	15,63	31,25	1000	1000	1000	1000
<i>T. rubrum</i> URM 1666	15,63	15,63	62,5	62,5	125	250
<i>E. floccosum</i> CCF-IOC-3757	250	1000	250	1000	500	1000
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	2,44	2,44	2,44	2,44	78,13	156,25
<i>C. albicans</i> isolado clínico	19,53	19,53	39,06	39,06	156,25	156,25

A análise dos dados da Tabela 3 permite verificar que o cetoconazol, a terbinafina e o itraconazol não inibiram os fungos *F. oxysporum* ATCC 48112 e *E. floccosum* CCF-IOC-3757 nas condições experimentais. Além disso, os dois fármacos azólicos não inibiram *F. solani* ATCC 36031 e a CIM verificada para a terbinafina frente a esse fungo mostrou que o mesmo foi resistente a esse fármaco. As demais espécies foram todas resistentes ao itraconazol, mas sensíveis à terbinafina. Todas as espécies foram sensíveis ao cetoconazol, exceto *M. gypseum* ATCC 14683, que foi considerada resistente a esse fármaco (CLSI, 2008; LACAZ, 2002).

Os dados da Tabela 4 mostraram que o cinamaldeído foi mais eficaz dentre os compostos avaliados. Além de ter sido ativo contra todas as espécies avaliadas, incluindo as linhagens de origem clínica, esse composto inibiu as três espécies que foram resistentes aos fármacos de referência mesmo em baixas concentrações. O eugenol, embora tenha sido ativo contra todas as espécies, apresentou valores de CIM consideravelmente superiores aos observados para o cinamaldeído. Além disso, apresentou ação fungistática frente a *E. floccosum* CCF-IOC-3757 à 1000 µg/mL. O  $\alpha$ -metil-*trans*-cinamaldeído apresentou valores de CIM iguais ou superiores aos observados para o eugenol, salvo para as espécies *M. gypseum* ATCC 14683, *T. rubrum* URM 1666 e *C. albicans* ATCC 10231. Dentre os compostos avaliados, somente o  $\alpha$ -metil-*trans*-cinamaldeído não foi ativo frente a *E. floccosum* CCF-IOC-3757 nas condições experimentais.

Quando o cinamaldeído foi associado ao eugenol, foi possível observar (Tabela 5) que, nas proporções 75 %/25 % ou 50 %/50 %, o valor da CIM se manteve o mesmo observado para o cinamaldeído frente à *C. albicans* ATCC 10231. Ainda, na associação com maior percentual de cinamaldeído, os valores de CIM se mantiveram os mesmos observados para esse composto isoladamente para os fungos *M. canis* ATCC 32903, *M. gypseum* ATCC 14683 e *C. albicans* isolado clínico. Ao se comparar o eugenol e as associações, verificou-se que a CIM, em quase todos os percentuais das associações, foi inferior à observada inicialmente para o eugenol. Nas associações onde o percentual de eugenol era de 50 % ou 75 %, observou-se, para *F. oxysporum* ATCC 48112 que o valor da CIM se manteve, mas a CFM foi menor que a observada para o eugenol e, em *E. floccosum* CCF-IOC-3757, em ambas as associações, verificou-se o redução do valor da CIM.

A classificação da associação quanto ao efeito pode ser verificada na Tabela 6 a seguir.

### 5.1.3 Classificação da associação de compostos quanto ao efeito

Tabela 6: Índice de concentração inibitória fracional (CIF) para as associações cinamaldeído/eugenol.

Micro-organismos	Cinamaldeído/Eugenol					
	75 %/25 %		50 %/50 %		25 %/75 %	
	CIF	Classificação	CIF	Classificação	CIF	Classificação
<i>T. mentagrophytes</i> ATCC 11481	32,00	antagônica	32,00	antagônica	64,02	antagônica
<i>T. mentagrophytes</i> isolado clínico	2,23	antagônica	2,23	antagônica	4,47	antagônica
<i>F. oxysporum</i> ATCC 48112	2,50	antagônica	5,01	antagônica	5,01	antagônica
<i>F. solani</i> ATCC 36031	2,13	antagônica	4,26	antagônica	8,51	antagônica
<i>M. canis</i> ATCC 32903	1,01	indiferente	64,03	antagônica	64,03	antagônica
<i>M. gypseum</i> ATCC 14683	1,03	indiferente	66,02	antagônica	66,02	antagônica
<i>T. rubrum</i> URM 1666	130,32	antagônica	521,08	antagônica	1042,17	antagônica
<i>E. floccosum</i> CCF-IOC-3757	2,25	antagônica	2,25	antagônica	4,50	antagônica
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1,01	indiferente	1,01	indiferente	32,15	antagônica
<i>C. albicans</i> isolado clínico	1,03	indiferente	2,06	antagônica	8,25	antagônica

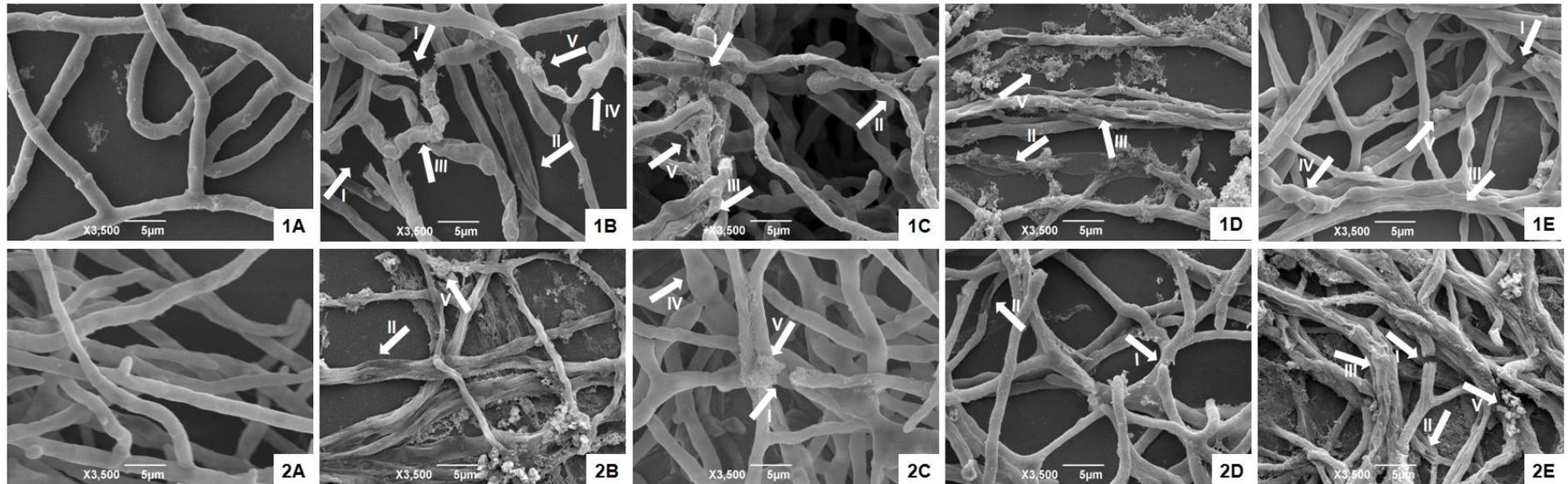
De acordo com a Tabela 6, a associação entre cinamaldeído e eugenol foi considerada indiferente para os fungos *M. canis* ATCC 32903, *M. gypseum* ATCC 14683 e *C. albicans* (ATCC 10231 e isolado clínico) na proporção de 75 % de cinamaldeído e 25 % de eugenol e para *C. albicans* ATCC 10231 em concentrações equimolares dos dois compostos. As demais associações foram consideradas antagônicas. Esses dados confirmam os achados da Tabela 5.

Como pode ser verificado nos resultados acima, o cinamaldeído foi o composto mais ativo frente a todos os fungos analisados. Dessa forma, essa substância foi selecionada para as avaliações de toxicidade aguda, microscopia eletrônica de varredura, avaliação da viabilidade celular, citometria de fluxo e para o desenvolvimento da formulação.

#### 5.1.4 Microscopia eletrônica de varredura

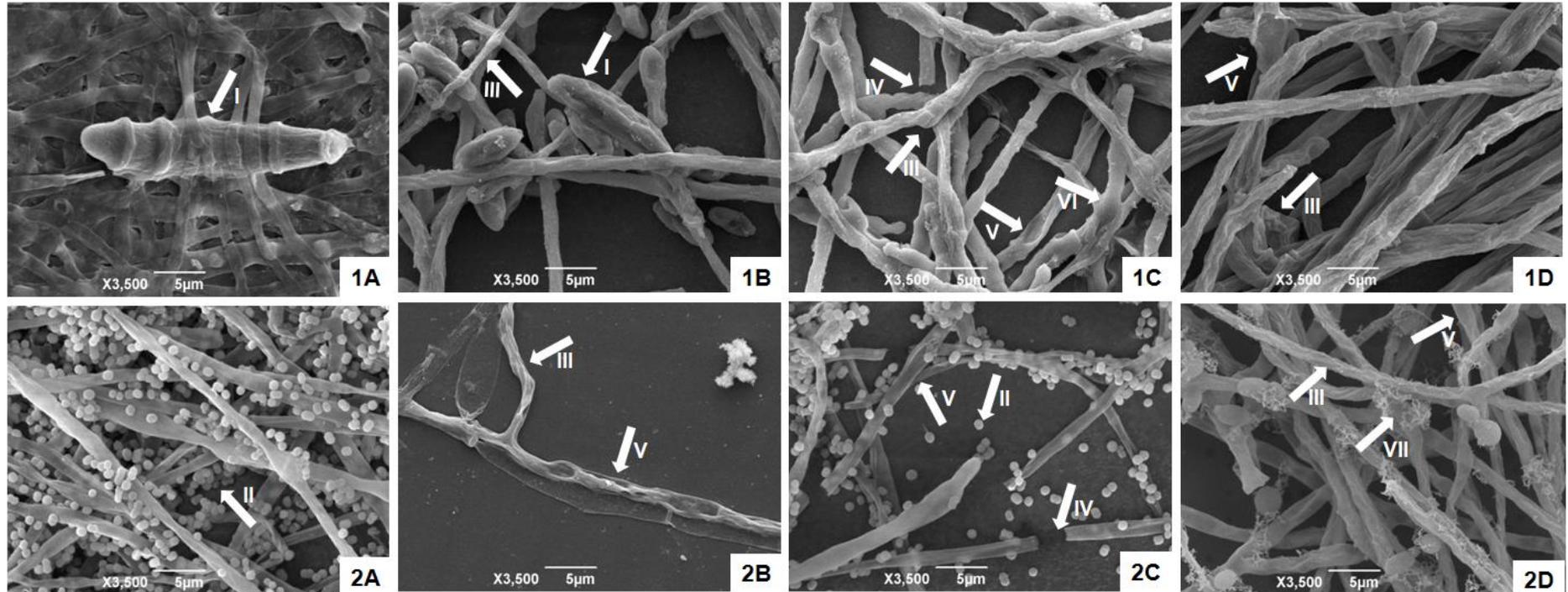
As eletromicrografias de varredura dos fungos não submetidos ao tratamento farmacológico e tratados com os fármacos de referência e cinamaldeído podem ser verificadas nas Figuras 17 a 20. Os fungos *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ATCC 48112, *F. solani* ATCC 36031 e *E. floccosum* CCF-IOC-3757 foram resistentes aos fármacos e, por isso, não foram registradas as eletromicrografias frente a essas substâncias.

Figura 17: Eletromicrografia de *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11481 e *M. gypseum* ATCC 14683.



1: *T. mentagrophytes*. 2: *M. gypseum*. (A): Micro-organismo não submetido ao tratamento farmacológico. (B): Tratamento farmacológico com itraconazol. (C): Tratamento farmacológico com terbinafina. (D): Tratamento farmacológico com itraconazol. (E): Tratamento farmacológico com cinamaldeído. I: região de quebra. II: achatamento. III: enrugamento. IV: intumescimento globular. V: material intracelular.

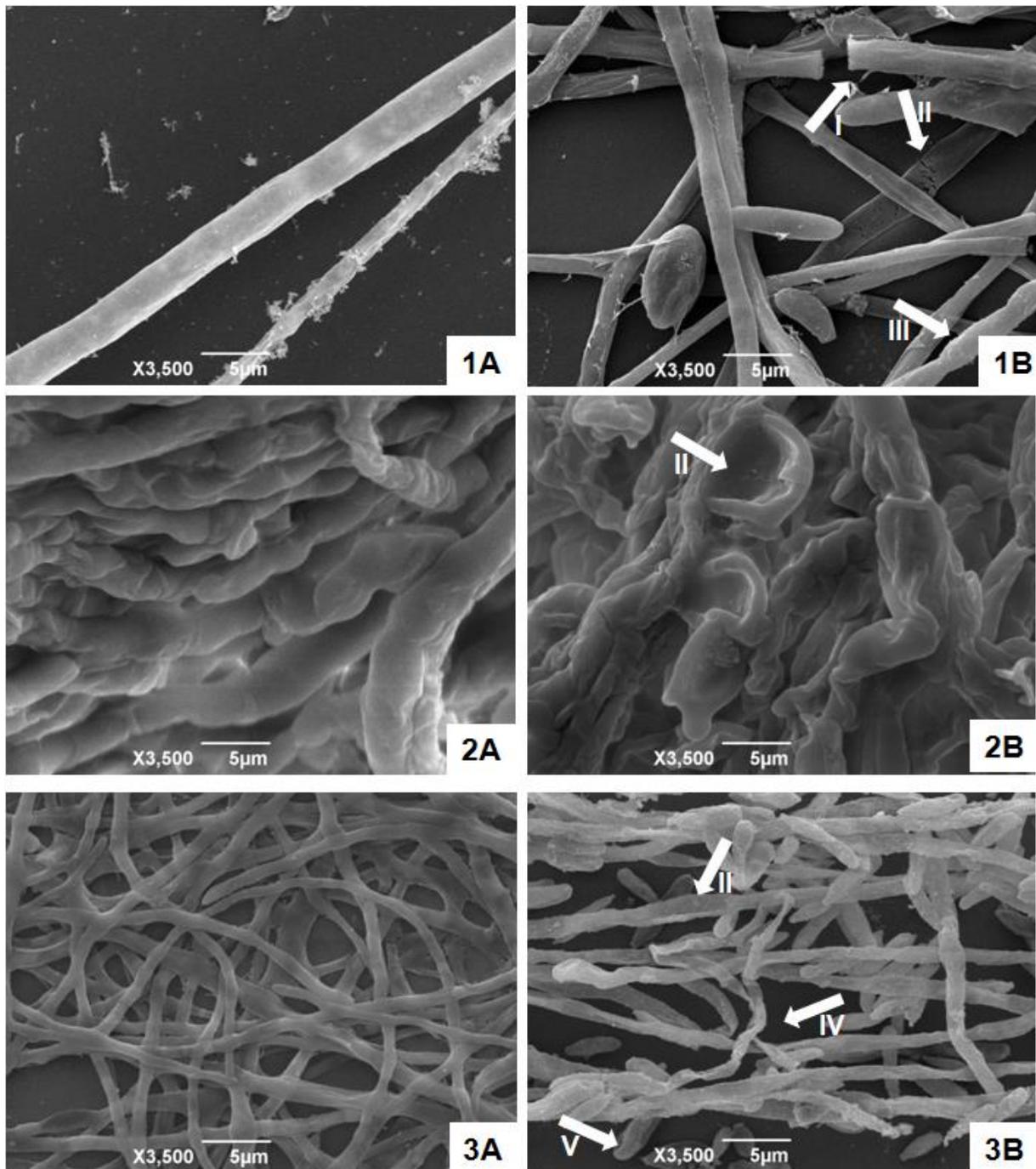
Figura 18: Eletromicrografia de *Microsporium canis* ATCC 32903 e *Trichophyton rubrum* URM 1666.



1: *M. canis*. 2: *T. rubrum*. (A): Micro-organismo não submetido ao tratamento farmacológico. (B): Tratamento farmacológico com cetoconazol. (C): Tratamento farmacológico com terbinafina. (D): Tratamento farmacológico com cinamaldeído.

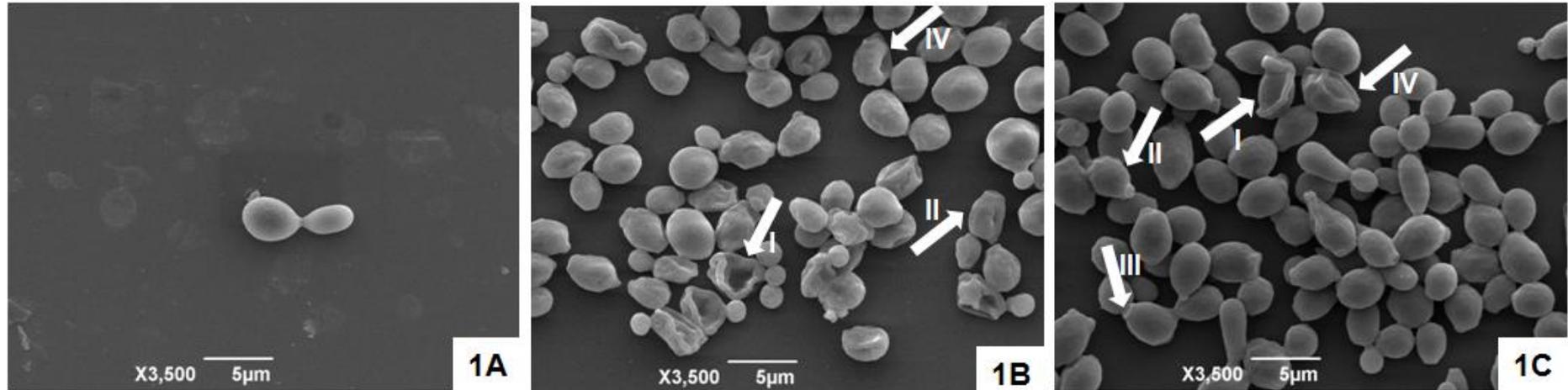
I: macroconídio. II: microconídio. III: enrugamento. IV: região de quebra. V: achatamento. VI: intumescimento. VII: material intracelular.

Figura 19: Eletromicrografia de *Fusarium oxysporum* ATCC 48112, *Fusarium solani* ATCC 36031 e *Epidermophyton floccosum* CCF-IOC-3757.



1: *F. oxysporum*. 2: *F. solani*. 3: *E. floccosum*. (A): Micro-organismo não submetido ao tratamento farmacológico. (B): Tratamento farmacológico com cinamaldeído. I: região de quebra. II: achatamento. III: intumescimento. IV: enrugamento. V: microconídio.

Figura 20: Eletromicrografia de *Candida albicans* ATCC 10231.



1A: Micro-organismo não submetido ao tratamento farmacológico. 1B: Tratamento farmacológico com anfotericina B. 1C: Tratamento farmacológico com cinamaldeído. I: perda de material intracelular. II: superfície irregular. III: cicatriz de brotamento não polar. IV: afrouxamento da membrana celular.

A avaliação das eletromicrografias de *T. mentagrophytes* ATCC 11481 (Figura 16-1A-E), mostrou hifas com padrão de crescimento normal e superfície regular, quando não submetidas ao tratamento farmacológico. Todos os tratamentos promoveram alterações no padrão de crescimento das hifas, com presença de regiões onde podem ser observadas hifas enrugadas e extravasamento de material intracelular. Os fármacos de referência também promoveram o achatamento das hifas e, nas eletromicrografias do cetoconazol, da terbinafina e do cinamaldeído, foram visualizadas regiões onde havia rompimento das estruturas. Além disso, os tratamentos com cetoconazol e cinamaldeído provocaram intumescimento globular, o qual pode ser verificado em algumas áreas.

A análise das imagens obtidas de *M. gypseum* ATCC 14683 (Figura 17-2A-E) mostrou hifas regulares quando não submetidas ao tratamento farmacológico. O tratamento com cetoconazol tornou as hifas enrugadas e pode ser verificado o extravasamento de material intracelular. Tanto a terbinafina quanto o itraconazol e cinamaldeído acarretaram o aparecimento de zonas de quebras das hifas. O primeiro fármaco ainda ocasionou o intumescimento da hifa e o extravasamento de material intracelular. O fungo, quando tratado com itraconazol, ainda apresentou regiões com hifas achatadas. O tratamento com cinamaldeído tornou as hifas completamente enrugadas e, além das quebras, foram verificadas regiões com achatamento e presença de material intracelular.

Na Figura 18 (1A-D), a eletromicrografia de *M. canis* ATCC 32903 mostrou a presença de macroconídio fusiforme, septado, de superfície regular quando o fungo não foi submetido ao tratamento farmacológico. Os tratamentos com cetoconazol, terbinafina e cinamaldeído tornaram as hifas enrugadas e, no tratamento com o primeiro fármaco, ainda é possível verificar a presença de um macroconídio também enrugado. A terbinafina e o cinamaldeído ocasionaram também o achatamento das hifas e o fármaco de referência provocou o intumescimento e a presença de zonas de quebras nas hifas.

*T. rubrum* URM 1666 (Figura 18-2A-D), quando não submetido ao tratamento, apresentou hifas e microconídios numerosos e com superfície regular. Os tratamentos com o cetoconazol e o cinamaldeído promoveram alteração desse padrão e foram observadas hifas achatadas e enrugadas. A terbinafina também provocou o achatamento, mas foi possível observar, além disso, a redução do número de microconídios e a presença de regiões de quebras nas hifas.

A Figura 19 (1A-B) mostrou que o padrão de crescimento de *F. oxysporum* ATCC 48112 condizia com hifas com padrão de crescimento normal. No entanto, por ação do cinamaldeído, observaram-se quebras, achatamento e intumescimento globular das hifas. Na Figura 18 (2A-B), *F. solani* ATCC 36031, apresentava hifas regulares, quando não submetido ao tratamento farmacológico, enquanto o cinamaldeído promoveu o achatamento das mesmas. A imagem de *E. floccosum* CCF-IOC-3757 (Figura 19-3A-B) exibiu hifas regulares e numerosas, mas o tratamento com o cinamaldeído alterou esse padrão e foram verificadas regiões de achatamentos, enrugamentos e presença de microconídio com superfície irregular.

A levedura *C. albicans* ATCC 10231 (Figura 20-1A-C) mostrou-se arredondada, com superfície regular e presença de brotamento, quando não submetida ao tratamento. Tanto a anfotericina B quanto o cinamaldeído promoveram alterações na forma normal do fungo, sendo observadas células sem conteúdo intracelular, com superfície irregular, presença de invaginações na membrana e de cicatriz de brotamento fora da região polar, afrouxamento da membrana e o recuo do material citoplasmático. Além disso, o tratamento com cinamaldeído levou ao surgimento de células mais alongadas, assemelhando-se a bastões.

## 5.2 Avaliação da atividade de fosfolipase em *C. albicans*

Para *C. albicans* ATCC 10231, semeada no meio de cultura para avaliação da fosfolipase isento de qualquer antifúngico, a média de Pz = 0,37.

Para *C. albicans* ATCC 10231 semeada em meio de cultura para avaliação da fosfolipase contendo 1,22 µg/mL de cinamaldeído, a média de Pz = 0,39.

O resultado acima mostrou que o cinamaldeído promoveu redução em 5,41 % da atividade de fosfolipase de *C. albicans* ATCC 10231 na concentração de 1/2 CIM.

## 5.3 Citometria de fluxo

Esse ensaio foi realizado com *F. oxysporum* ATCC 48112 e foram detectados 2000 eventos com o citômetro de fluxo BD Accuri™ C6, utilizando os filtros FL1 (BODIPY 493/503) e FL2 (MitoTracker Red CMXRos).

### 5.3.1 Alterações na presença de lipídios neutros

Os resultados do experimento indicaram que houve um ligeiro aumento na presença de lipídios neutros após o tratamento com 0,125 µg/mL de anfotericina B. Por outro lado, o tratamento com 0,25 µg/mL de cinamaldeído induziu ligeira redução na presença destes lipídios, quando comparado ao controle (Tabela 7).

Tabela 7: Avaliação da presença de lipídios neutros, com o marcador BODIPY 493/503.

<sup>a</sup> Média e desvio padrão da intensidade de fluorescência.

Intensidade de fluorescência <sup>a</sup> (unidade arbitrária)	
Controle	315.873,96 ± 0,89
Anfotericina B	354.598,11 ± 0,86
Cinamaldeído	303.297,09 ± 0,82

### 5.3.2 Alterações na atividade mitocondrial

O fungo submetido ao tratamento com o cinamaldeído exibiu ligeira redução da viabilidade celular, enquanto o tratamento com anfotericina B não provocou alteração, quando comparado ao controle (Gráfico 1).

O tratamento com cinamaldeído também provocou ligeira redução da intensidade de fluorescência da marcação com a sonda, sugerindo que estas células encontravam-se com a atividade mitocondrial reduzida. O mesmo foi observado após o tratamento com anfotericina B (Tabela 8).

Gráfico 1: Histograma ilustrando a porcentagem de células marcadas com MitoTracker Red CMXRos.

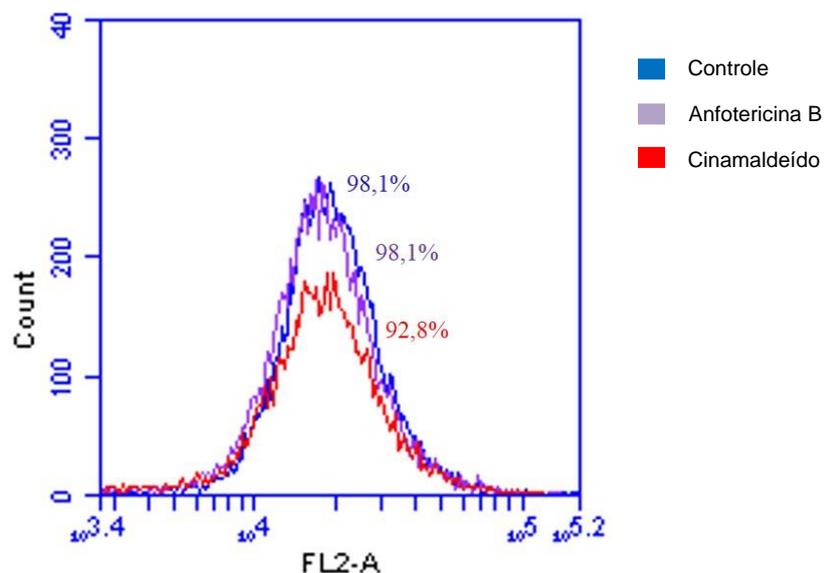


Tabela 8: Resultados utilizando o marcador MitoTracker Red CMXRos.

<sup>a</sup> Média e desvio padrão da intensidade de fluorescência.

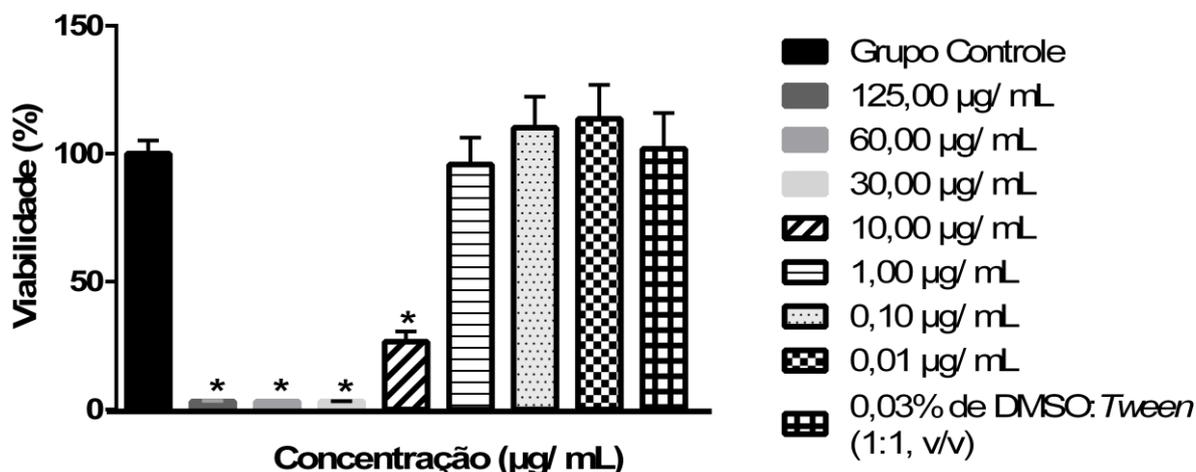
Intensidade de fluorescência <sup>a</sup> (unidade arbitrária)	
<b>Controle</b>	20.601,37 ± 0,53
<b>Anfotericina B</b>	19.843,07 ± 0,62
<b>Cinamaldeído</b>	19.398,89 ± 0,61

## 5.4 Ensaios de toxicidade

### 5.3.1 Ensaio pelo método de MTT

O cinamaldeído foi avaliado entre 0,01 µg/mL e 125 µg/mL (Gráfico 2) e essa faixa foi estabelecida conforme dados obtidos no ensaio para a determinação da CIM.

Gráfico 2: Percentual de viabilidade celular em função da concentração de cinamaldeído.



\* As médias diferem das médias obtidas para o grupo controle ( $p < 0,05$ ).

A concentração que inibe 50 % do crescimento das células ( $CI_{50}$ ) foi obtida a partir da regressão linear dos dados:  $CI_{50} = 4,86 \mu\text{g/mL}$ .

Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão e significância estatística de 0,05 %.

A avaliação do Gráfico 1 mostrou que a viabilidade celular foi inferior a 50 % entre 125 µg/mL e 10 µg/mL ( $p < 0,05$ ). Entre 1 µg/mL e 0,01 µg/mL, os percentuais

de viabilidade celular foram estatisticamente semelhantes ao grupo controle (isento de antifúngico) ( $p < 0,05$ ).

#### 5.4.2 Ensaio com *D. magna*

O ensaio de toxicidade aguda foi realizado com o modelo de *Daphnia magna*. A  $CE_{50}$  observada após 48 h no ensaio com microcrustáceos foi de 1,85 mg/L de cinamaldeído, sendo, portanto, considerado moderadamente tóxico, conforme Zucker (1985) *apud* Manrique (2009).

#### 5.5 Ensaio com a formulação farmacêutica

O aspecto da formulação preparada, na forma de suspensão, pode ser observado a seguir (Figura 21):

Figura 21: Aspecto da suspensão de cinamaldeído a 2 %



Os resultados obtidos no ensaio com a formulação, podem ser verificados na Tabela 9.

Tabela 9: Atividade antifúngica da formulação.

<b>Fungo</b>	<b>% de ativo</b>	<b>Concentração de ativo em µg/mL</b>
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1	200,36
<i>F. oxysporum</i> ATCC 48112	1	200,36
<i>T. mentagrophytes</i> ATCC 11481	0,5	100,18
<i>M. gypseum</i> ATCC 14683	0,5	100,18

## 6 DISCUSSÃO

O tratamento das micoses nem sempre é efetivo, dada a possibilidade de recorrência da infecção, resistência dos micro-organismos e possível toxicidade. Essa questão leva à busca constante por novos fármacos mais ativos e seguros que os disponíveis. Embora a maioria dos antifúngicos existentes no mercado seja de origem sintética, a busca por produtos naturais, com base no uso etnofarmacológico tem merecido atenção (FENNER et al., 2006; HAFEEZ et al., 2013; KHAN, AHMAD e CAMEOTRA, 2013).

Nesse contexto, os metabólitos secundários dos vegetais têm se destacado por suas propriedades medicinais (TEIXEIRA, 2007). A escolha destes compostos para o estudo se baseou, principalmente, na atividade antifúngica já descrita para os mesmos (LEE et al., 2007; KHAN et al., 2012; TEJESWINI et al., 2014), o que os torna potenciais antifúngicos para o tratamento de fungos causadores da onicomicose. Além disso, o cinamaldeído e o eugenol são provenientes da mesma rota biossintética nas plantas (NATH, BARUAH e KANJILAL, 2006).

De acordo com a classificação estabelecida pelo CLSI (2008) para resistência dos micro-organismos foi possível verificar que *F. oxysporum* ATCC 48112, *F. solani* ATCC 36031 e *E. floccosum* CCF-IOC-3757 foram considerados resistentes aos fármacos azólicos testados e à terbinafina.

Os micro-organismos do gênero *Fusarium* são, geralmente, resistentes aos tratamentos disponíveis. Apesar de serem sensíveis à anfotericina B e apresentarem perfis variados de susceptibilidade ao voriconazol e ao posaconazol, a terapia clínica requer a associação de fármacos para o tratamento (SPADER et al., 2013). Spader e colaboradores (2013) verificaram o efeito sinérgico, quando voriconazol foi associado à terbinafina, com 84 % das espécies do gênero *Fusarium* sendo inibidas por essa associação e ausência de antagonismo. Nesse mesmo estudo, os fungos haviam sido resistentes ao itraconazol (MIC > 16 µg/mL), corroborando os achados dessa tese. Spader e colaboradores (2013) verificaram ainda que quando o itraconazol foi associado à terbinafina, o sinergismo foi de 25 % e ausência de antagonismo.

Lima e coladores (2011) avaliaram a prevalência e o perfil de susceptibilidade de dermatomicoses em idosos institucionalizados na Venezuela. Dentre as espécies isoladas das unhas dos pés, detectaram *F. oxysporum*, que se mostrou sensível ao

itraconazol (CIM  $\leq$  0,125  $\mu\text{g/mL}$ ) e ao fluconazol (CIM  $\leq$  0,125  $\mu\text{g/mL}$ ) *in vitro*, o que diferiu dos achados dessa tese e merece atenção, já que Lima e colaboradores (2011) avaliaram isolados clínicos, os quais já haviam sido expostos a algum tratamento farmacológico.

Diogo e colaboradores (2010), verificaram que *F. oxysporum* foi resistente à terbinafina com halo de inibição  $< 12$  mm, utilizando discos de 2  $\mu\text{g/mL}$  do fármaco. Esse valor correspondia à CIM de 8  $\mu\text{g/mL}$  no método de microdiluição, considerado maior que a dose sérica encontrada para a terbinafina. Esses achados confirmam o perfil de resistência observado nessa tese. Por outro lado, esses autores também verificaram que *E. floccosum* foi sensível à terbinafina, o que foi de encontro ao observado neste trabalho. Badali e colaboradores (2015) evidenciaram espécies clínicas de *E. floccosum* sensíveis ao itraconazol e à terbinafina (MIC 1 - 4  $\mu\text{g/mL}$  e MIC 0,016 - 0,063  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente), de acordo com Diogo e colaboradores (2010).

Todas as espécies foram sensíveis à terbinafina, o que corroborou os achados de Diogo e colaboradores (2010) ao avaliarem *T. mentagrophytes*, *M. canis*, *M. gypseum* e *T. rubrum*, Badali e colaboradores (2015), ao avaliarem a susceptibilidade de *T. rubrum* e Patankar, Bhargava e Ahluwaia (2014) para *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* e *M. canis*.

Por outro lado, Badali e colaboradores (2015) também verificaram a susceptibilidade de *T. rubrum* ao itraconazol, o que diferiu dos achados dessa tese, em que todas as espécies avaliadas foram consideradas resistentes a esse fármaco. Além disso, *M. gypseum* ATCC 14683 também foi considerado resistente ao cetoconazol, como no trabalho de Gupta e Jain (2015), em que cetoconazol foi utilizado como fármaco de referência frente a *M. gypseum* e a CIM observada foi de 6,25  $\mu\text{g/mL}$ .

Azambuja e colaboradores (2014), ao avaliarem amostras de 100 pacientes com suspeita clínica de onicomicose, identificaram *T. rubrum* em 12 amostras. Desses isolados, 66,7 % foram resistentes ao fluconazol (MIC  $> 4$   $\mu\text{g/mL}$ ); 25 % exibiram MIC considerado alto para itraconazol (MIC  $\geq$  0,25  $\mu\text{g/mL}$ ) e 8,3 %, para ciclopirox olamina (MIC  $> 1$   $\mu\text{g/mL}$ ) e para terbinafina (MIC  $> 0,5$   $\mu\text{g/mL}$ ).

Para *C. albicans*, tanto a espécie padrão (ATCC 10231), quanto o isolado clínico foram consideradas susceptíveis à anfotericina B (CIM  $< 1$   $\mu\text{g/mL}$ ) (LACAZ et al., 2002). Da mesma forma, Silva e colaboradores (2013) verificaram, dentre 77 micro-

organismos do gênero *Candida*, que todos foram susceptíveis a esse fármaco em concentrações inferiores a 0,25 µg/mL. No entanto, Pereira A. e colaboradores (2011) observaram isolados clínicos de *C. albicans* resistentes ao antifúngico, com CIM entre 0,125 e 4 µg/mL e Khan, Ahmad e Cameotra (2013) verificaram CIM de 1 µg/mL também frente ao isolado clínico.

O ensaio preliminar permitiu verificar o panorama de susceptibilidade dos fungos aos compostos avaliados e associações, não sendo reprodutível somente na verificação de eugenol frente aos fungos do gênero *Fusarium*, quando comparado ao ensaio para a determinação da CIM. Cumpre informar que, por utilizar um fragmento fúngico e não um quantitativo de células padronizado, o resultado pode ser subestimado. Embora não substitua o ensaio de determinação da CIM, como estudo prévio de ação dos compostos, esse ensaio atendeu ao objetivo.

Os resultados de CIM mostraram que o cinamaldeído, isoladamente, foi ativo contra todas as linhagens testadas (0,12 a 125 µg/mL) e foi mais ativo que eugenol (62,5 a 1000 µg/mL) e  $\alpha$ -metil-*trans*-cinamaldeído (31,25 a > 1000 µg/mL) frente a todos os micro-organismos. Além disso, apresentou atividade contra *F. oxysporum* ATCC 48112, *F. solani* ATCC 36031 e *E. floccosum* CCF-IOC-3757, os quais não foram susceptíveis aos fármacos de referência e foi mais ativo que esses fármacos contra *T. rubrum* URM 1666.

Esses achados são promissores e, vale ressaltar que, a inibição de espécies do gênero *Fusarium* é importante, já que são fungos resistentes à maioria das terapias disponíveis e, por ser menos frequente que aspergiloses e candidíases, permanecem sem um tratamento adequado (SPADER et al., 2013).

Esses resultados foram superiores aos verificados por Pereira A. e colaboradores (2011), ao avaliarem a atividade do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* frente a leveduras do gênero *Candida* isoladas de candidose invasiva, já que os autores encontraram CIM entre 200 e 6.250 µg/mL.

Shreaz e colaboradores (2010) também verificaram resultados satisfatórios ao analisarem o cinamaldeído, o qual foi capaz de reduzir em 58 % a síntese de ergosterol de *C. albicans*. Além disso, promoveu 41 % de inibição de extrusão de prótons, através da membrana plasmática, por meio da enzima ATPase de membrana plasmática, a qual gera um gradiente de membrana importante ao transporte de nutrientes. Além disso, os autores constataram que esse composto podia funcionar

como reagente para a síntese de ligantes e/ou complexos com metais, com a melhoria da atividade antifúngica.

Kim e colaboradores (2011) verificaram, em seus estudos, que o cinamaldeído também foi o composto mais ativo, ao lado de 2-hidróxi-5-metóxi-benzaldeído, exibindo CIM de 0,58 mM (76,6 µg/mL) ± 0,2 mM frente aos fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium expansum*. Da mesma forma, Khan e Ahmad (2011) estabeleceram valores de CIM e de CFM de 40 µg/mL e 80 µg/mL, respectivamente, frente às linhagens de *T. rubrum* IOA-9 e MTCC 296, ao testar o cinamaldeído. No entanto, estes valores dobraram quando o composto avaliado foi o eugenol (80 µg/mL e 160 µg/mL, respectivamente). Os autores observaram ainda o efeito sinérgico quando o cinamaldeído foi associado ao fluconazol. Esses estudos estão em conformidade com os dados do presente trabalho, no qual o cinamaldeído apresentou a melhor atividade antifúngica.

Shreaz e colaboradores (2012) verificaram valores de CIM<sub>90</sub> entre 125 e 450 µg/mL para o cinamaldeído, ao avaliarem uma espécie de *C. albicans* padrão e 26 isolados clínicos e Khan, Ahmad e Cameotra (2013) verificaram CIM de 100 µg/mL frente a um isolado clínico. Esses dados foram superiores aos observados nessa tese (2,44 e 19,53 µg/mL, para a espécie padrão e isolado clínico, respectivamente).

Assim como para o cinamaldeído, estudos mostraram que o óleo de canela também apresentou atividade antifúngica considerável, sendo que Lima e colaboradores (2006), ao avaliarem a atividade do óleo essencial de *C. zeylanicum* sobre leveduras do gênero *Candida*, por meio da metodologia de difusão em meio sólido, verificaram que o mesmo foi capaz de inibir o crescimento de 58 % das linhagens avaliadas. Nasir (2010) verificou que o óleo de *C. zeylanicum* exibiu CIM de 0,31 µL/mL contra *Trichophyton* sp isolado de *tinea unguium*. Wang e colaboradores (2012) obtiveram CIM de 64 µg/mL frente à *C. albicans* espécie padrão e isolado clínico, utilizando o óleo de canela, a qual foi superior aos valores obtidos neste trabalho, o que pode indicar teor de cinamaldeído, nesse óleo, inferior ao utilizado nesta tese. Da mesma forma que o cinamaldeído foi mais ativo que o eugenol neste estudo, Shirurkar e Wahegaokar (2012) e Sanla-Ead e colaboradores (2011) verificaram que o óleo de canela foi mais efetivo que o óleo de cravo frente a *F. solani* e *C. albicans*, respectivamente.

Ascenção e Filho (2013) verificaram a inibição completa do crescimento de *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* e f. sp. *vasinfectum*, utilizando 1 µL/mL de óleo de

cravo contendo 52,53 % de eugenol (correspondente a 525,3 µg/mL de eugenol), utilizando discos com crescimento fúngico sobre ágar batata dextrose com o agente antifúngico. No presente estudo, foi estabelecida CIM de 62,5 µg/mL para o eugenol na inibição de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, o que pode indicar que compostos presentes no óleo essencial poderiam exercer antagonismo na atividade antifúngica.

A CIM encontrada para o eugenol, nesse estudo (250 µg/mL), frente a *T. rubrum* URM 1666 corrobora os achados Gong e colaboradores (2016), os quais reportaram concentração de 256 µg/mL para o eugenol frente a *T. rubrum*. Além disso, Pereira e colaboradores (2013) analisaram a ação antifúngica frente a duas linhagens desse micro-organismo e também obtiveram valores de CIM de 256 µg/mL. Em relação ao mecanismo de ação do eugenol, os últimos autores verificaram a redução do crescimento micelial do fungo e interferência com a integridade da membrana celular, por mecanismo sugestivo de ação sobre a biossíntese do ergosterol.

Pinto e colaboradores (2009) verificaram, ao testar o eugenol, CIM de 0,64 µL/mL (545,92 µg/mL) e CFM na faixa de 0,64 a 1,25 µL/mL (545,92 µg/mL a 1091,84 µg/mL), respectivamente, frente à *C. albicans* ATCC 10231 e Khan, Ahmad e Cameotra (2013) verificaram CIM de 400 µg/mL frente a um isolado clínico desse fungo, os quais foram inferiores aos dados dessa pesquisa. Além disso, frente aos fungos dermatófitos, observaram CIM e CFM de 0,16 µL/mL (136,48 µg/mL) e 0,32 µL/mL (272,96 µg/mL), respectivamente para *T. mentagrophytes*; 0,08 µL/mL (68,24 µg/mL) e 0,16 µL/mL (136,48 µg/mL), para *M. canis*; 0,16 µL/mL (136,48 µg/mL) e 0,32 µL/mL (272,96 µg/mL), para *M. gypseum*, *T. rubrum* e *E. floccosum*. Todas essas concentrações foram inferiores aos valores encontrados nessa tese, exceto para o fungo *T. mentagrophytes*, que teve CIM de 125 µg/mL. Estudo posterior, avaliando a ação do óleo de cravo sobre *T. mentagrophytes*, *M. canis*, *M. gypseum*, *T. rubrum* e *E. floccosum* e evidenciou que a atividade foi superior a 60 %, na dose de 200 µg/mL (CORTÉS-ROJAS, SOUZA e OLIVEIRA, 2014).

Em relação ao  $\alpha$ -metil-*trans*-cinamaldeído, Shreaz e colaboradores (2011) estabeleceram CIM<sub>90</sub> de 250 µg/mL frente à *C. albicans* ATCC 44829 para esse composto. Esse valor reduziu para 60 e 50 µg/mL quando o ligante que foi sintetizado por esses autores, a partir da condensação de  $\alpha$ -metil-*trans*-cinamaldeído e etilenodiamina, foi complexado com cobalto e níquel, respectivamente. Da mesma forma, a interferência na biossíntese do ergosterol foi maior para o ligante isolado e para esses dois complexos, alcançando 93 % com o complexo de níquel; o que

possibilitou aos autores inferirem que a biossíntese do ergosterol é um alvo de ação do  $\alpha$ -metil-*trans*-cinamaldeído. Cumpre ressaltar que os valores de CIM<sub>90</sub> obtidos para os complexos, considerados satisfatórios, foram menores que o verificado para  $\alpha$ -metil-*trans*-cinamaldeído nesta tese. Porém, esses resultados foram cerca de vinte vezes maior que o obtido para o cinamaldeído neste trabalho (2,44  $\mu$ g/mL), frente à *C. albicans* ATCC 10231 ou cerca de três vezes a CIM verificada para a levedura de origem clínica (19,53  $\mu$ g/mL).

Shreaz e colaboradores (2012) encontraram CIMs entre 62,5 e 250  $\mu$ g/mL para os derivados hidróxi e metóxi do benzaldeído (derivados do cinamaldeído) frente à *C. albicans* padrão e isolado clínico. Esses resultados foram inferiores aos observados nessa tese para o  $\alpha$ -metil-*trans*-cinamaldeído (312,5 e 625  $\mu$ g/mL, para a espécie padrão e isolado clínico, respectivamente).

A avaliação da relação estrutura-atividade dos compostos derivados do ácido cinâmico, realizada por Cheng e colaboradores (2008), mostrou que a presença dos grupamentos aldeído ou ácido carboxílico, associados a uma dupla ligação conjugada e a uma cadeia carbônica externa ao anel aumentou da atividade antifúngica. Nesse sentido, segundo os mesmos autores, *trans*-cinamaldeído e  $\alpha$ -metil-*trans*-cinamaldeído seriam antifúngicos mais ativos que o eugenol.

Shreaz e colaboradores (2011) afirmaram, ainda, que o anel aromático, o tamanho da cadeia carbônica ligada ao anel e a lipofilicidade elevavam a atividade antifúngica do cinamaldeído. Para Khan e colaboradores (2012) a presença do grupamento metil em  $\alpha$ -metil-*trans*-cinamaldeído promovia aumento da cadeia carbônica alifática, com conseqüente aumento da lipofilicidade e de sua atividade. Esses autores obtiveram CIM<sub>90</sub> entre 100 e 250  $\mu$ g/mL para *C. albicans* sensíveis ao fluconazol e CIM<sub>90</sub> entre 100 e 200  $\mu$ g/mL frente às linhagens resistentes a esse fármaco.

No presente trabalho, observou-se o aumento da atividade antifúngica do cinamaldeído em relação ao eugenol, o que confirmou o trabalho de Cheng e colaboradores (2008) supracitado, já que esse último composto não apresenta as funções aldeído ou ácido carboxílico. Além disso, tal fato também pode se justificar pela presença de dois grupos doadores de elétrons nas posições *meta* (metóxi) e *para* (hidroxila) na molécula do eugenol, o que, segundo Sahu e colaboradores (2015), poderia reduzir a atividade antifúngica.

Embora estudos indicassem que a inserção do grupamento metil na molécula de *trans*-cinamaldeído, para formar  $\alpha$ -metil-*trans*-cinamaldeído, pudesse potencializar a ação desse composto (SHREAZ et al., 2011; KHAN et al., 2012), o mesmo não apresentou aumento da atividade antifúngica em relação ao eugenol, como previsto pelos estudos de relação estrutura-atividade de Cheng e colaboradores (2011). Kim e colaboradores (2011) também verificaram que a presença de um grupo metil reduziu a atividade antifúngica de análogos do benzaldeído frente a *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus* e *Penicillium expansum*. Kong e colaboradores (2007) também observaram que a inserção desse grupamento, na molécula de cinamaldeído, promoveu a redução da atividade nematocida. Dessa forma, é possível concluir que a metilação também pode alterar a bioatividade dos compostos e sua interação com os receptores, dada a influência estereoeletrônica que sua inserção pode provocar (BARREIRO, KÜMMERLE e FRAGA, 2011).

A associação entre cinamaldeído e eugenol foi considerada antagônica (índice CIF > 2), na maioria dos casos ou indiferente frente às espécies avaliadas (índice  $1 < \text{CIF} < 2$ ). Houve uma relação inversa entre a concentração de eugenol na associação e a atividade antifúngica, o que indicou que o cinamaldeído era o responsável pela ação. Dessa forma, a diluição do cinamaldeído acarretou na redução do efeito. Essa conclusão é válida dado que uma reação de adição na ligação dupla do alceno do cinamaldeído ou substituição eletrofílica aromática no mesmo composto só ocorreriam com a presença de catalisadores adequados, como o cloreto de alumínio.

Por outro lado, Matan e Matan (2007) verificaram ação sinérgica na associação dos óleos de canela e cravo, na razão de 5 : 1 (canela : cravo) contra os fungos *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* e *Penicillium* sp. Nesse caso, o óleo essencial de canela continha entre 70 e 74 % de cinamaldeído. Além disso, Ye e colaboradores (2013) verificaram sinergismo na combinação entre cinamaldeído e carvacrol frente a 7 de 11 espécies de bactérias avaliadas.

Com o uso da avaliação morfológica das linhagens de interesse, por meio de microscopia eletrônica de varredura, foi possível observar alterações morfológicas nas estruturas fúngicas após o tratamento com cinamaldeído.

Xing e colaboradores (2014), ao analisarem a ação do cinamaldeído sobre *Fusarium verticillioides* na concentração de 30  $\mu\text{L}$ /placa de *petri*, observaram alteração sobre o micélio, nas regiões apicais e ao longo do comprimento da hifa.

Essas hifas se tornaram delgadas, sinuosas e apresentaram sinais de encolhimento. Além disso, os autores observaram danos à parede celular, com ruptura da mesma.

Outro estudo avaliou a ação de terpenos sobre *T. mentagrophytes* e os autores visualizaram que, em concentrações mais elevadas, em especial 0,09 mg/mL de citral, as células fúngicas exibiam alterações morfológicas marcantes. Nesse caso, atribuíram as alterações observadas à possível destruição de organelas citoplasmáticas, fato que foi confirmado na microscopia de transmissão (PARK et al., 2009).

Tatsumi e colaboradores (2013), ao analisarem a ação de efinaconazol sobre *T. mentagrophytes* observou a presença de achatamento das hifas, sendo o mecanismo de ação desse fármaco relacionado à redução da biossíntese de ergosterol e acúmulo de precursores desse esterol.

Pannu e colaboradores (2009) ao avaliarem uma emulsão óleo em água (óleo purificado, cloreto de cetilpiridínio, etanol, polissorbato 20 e água), designada por NB-002, para o tratamento de pele, de cabelos e de unhas acometidos por fungos, observaram, por meio das eletromicrografias, que o composto promoveu ruptura da superfície de *T. rubrum*, com consequente lise celular. Além disso, após a exposição ao composto não havia hifas ou microconídios viáveis.

Nas eletromicrografias de *C. albicans* ATCC 10231, as alterações observadas nas células submetidas ao tratamento com cinamaldeído confirmam os achados de Shreaz e colaboradores (2013), os quais verificaram a presença de enrugamento da superfície celular e extravasamento de material intracelular em quantidades consideráveis, após o tratamento com cinamaldeído e seus derivados. Essas alterações também foram verificadas quando as leveduras foram tratadas com anfotericina B neste trabalho.

Tagushi e colaboradores (2013) verificaram que o cinamaldeído a 40 µg/mL provocava deformidade nas células de *C. albicans*, com distorção, colapso e esfoliação da superfície celular. Na presente pesquisa, também foram observadas células colapsadas e sem conteúdo intracelular após os dois tratamentos (cinamaldeído e anfotericina B). A presença dessas células colapsadas indica alterações na permeabilidade seletiva da membrana, com reflexos no equilíbrio osmótico da célula (KHAN, AHMAD e CAMEOTRA, 2013).

Shreaz e colaboradores (2013) atribuíram o mecanismo de ação anti-candida do cinamaldeído à redução do pH intracelular, inibição da ATPase de membrana

plasmática e depleção de fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídio reduzido (NADPH), sendo que essa última alteração, levava, eventualmente, a danos na parede e membrana celular da levedura, conforme esses autores observaram nas eletromicrografias de varredura e transmissão.

Khan, Ahmad e Cameotra (2013), verificaram que o cinamaldeído provocou, a 50 µg/mL, danos à superfície celular, presença de cicatriz de brotamento não polar e a membrana celular tornou-se frouxa e houve recuo do material citoplasmático, com consequente lise celular, em conformidade com os achados dessa tese. Essas cicatrizes de brotamento indicam que o composto foi capaz de interferir no processo de divisão normal da levedura, que tentou se multiplicar, mas sem sucesso (KHAN, AHMAD e CAMEOTRA, 2013).

O tratamento de *C. glabrata* com *orto*-metóxi-cinamaldeído, outro derivado sintético do cinamaldeído, também promoveu alterações na morfologia celular com a formação de invaginações na membrana, conforme observado por Bathia e colaboradores (2012).

Os dados de atividade de fosfolipase de *C. albicans* ATCC 10231 mostraram que o cinamaldeído a 1,22 µg/mL reduziu em 5,41 % a secreção da enzima. Esses resultados estão de acordo com os estudos de Shreaz e colaboradores (2013) no qual o cinamaldeído também promoveu redução da atividade enzimática, quando avaliado a 1/4 ou 1/2 da CIM e essa redução foi dose-dependente. Os autores ainda informaram que a fosfolipase é uma enzima importante na patogênese fúngica, já que atua nos lipídios de membrana, facilitando a penetração do fungo e, para *C. albicans*, a atividade dessa enzima está relacionada a maior virulência.

Segundo Karkowska-Kuleta, Rapala-Kozik e Kozik (2009), a atividade de fosfolipase é particularmente elevada durante o processo de invasão dos tecidos. O fato de o cinamaldeído reduzir a secreção dessa enzima é importante, pois a formulação contendo esse composto seria eficaz tanto no tratamento quanto na profilaxia da onicomicose.

Pereira A. e colaboradores (2011) observaram que, dentre 28 isolados de *C. albicans*; 27, apresentaram atividade classificada como moderada ou forte. Nesta tese, a atividade foi classificada como forte (Pz = 0,37).

Em relação aos ensaios de toxicidade aguda, o cinamaldeído foi classificado, em relação ao risco ambiental, como moderadamente tóxico para microcrustáceos (CE<sub>50</sub> = 1,85 mg/L).

Halm-Lemeille e colaboradores (2014), ao avaliarem a toxicidade sobre algas verdes da espécie *Pseudokirchneriella subcapitata* e hemácias de *Haliotis tuberculata* verificaram que a toxicidade aguda foi espécie-dependente. Korosec e colaboradores (2013) reportaram os derivados do ácido cinâmico sintetizados como de baixa toxicidade para peixes e anfíbios, o que consideraram importante no desenvolvimento de novos fármacos não tóxicos a humanos e animais.

É necessário considerar que os medicamentos podem contaminar o ambiente aquático por meio de efluentes produzidos pelas indústrias farmacêuticas (MASELLI et al., 2013) ou através de eliminação por urina e fezes de humanos e animais tratados (NUNES, 2010). No primeiro caso, o tratamento químico dos efluentes pode até mesmo aumentar a toxicidade e o risco ao ambiente, como observado por Maselli e colaboradores (2013).

González-Ortegón e colaboradores (2013) informaram que o clotrimazol, antifúngico amplamente utilizado na saúde humana e animal, foi detectado em elevadas concentrações em rios na Alemanha e rios e estuários no Reino Unido. Esses autores estudaram o efeito desse antifúngico em larvas de camarão *Palaemon serratus* e observaram que essa substância promoveu alteração nas taxas de crescimento e desenvolvimento larval. O efeito foi ainda mais pronunciado quando os animais eram previamente submetidos a algum tipo de estresse. O estudo mostrou que o fármaco exibiu sua ação na concentração de 2,78 µg/L quando os animais foram mantidos em salinidade correspondente a da água do mar (32 Unidades de Salinidade Prática). Essa concentração foi ainda menor (0,14 µg/L) com água de menor salinidade (20 Unidades de Salinidade Prática).

Um trabalho realizado por Yamamoto e colaboradores (2012) revelou que o anti-hipertensivo Losartan possuía improvável risco ecológico, uma vez que as concentrações efetivas nos ensaios de toxicidade aguda (175,26 mg/L) e crônica (100 mg/L) frente a *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia*, respectivamente, foram superiores às concentrações já observadas no ambiente. No entanto, esse estudo não considerou a possível bioacumulação e que efeitos subletais também podem acarretar alterações nos organismos marinhos (DURINGER et al., 2010).

Li, Li e Handak (2010) avaliaram a ação do verapamil, um bloqueador dos canais de cálcio frequentemente prescrito a pacientes com distúrbios cardiovasculares, sobre o peixe truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Em concentrações subletais, os autores observaram alteração do comportamento normal dos animais, respostas

antioxidantes tecido-específicas e alteração na razão ácido ribonucleico (ARN) / ADN no músculo do peixe. Além disso, a concentração de 2,72 mg/L provocou a morte de 50 % dos animais em 96 h de ensaio estático.

Leite e colaboradores (2012), ao avaliarem a toxicidade de compostos fenólicos sobre embriões de ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*, identificaram que o fenol foi tóxico a esses organismos a partir de 1 mg/L. No entanto, o limite permitido pelo CONAMA (BRASIL, 2011) para fenóis totais em efluentes é 0,5 mg/L, o que não seria tóxico a essa espécie.

O ensaio conduzido para a avaliação dos efeitos ecotoxicológicos dos óleos essenciais de *Juniperus occidentalis* e *Chamaecyparis lawsoniana* mostrou que o óleo proveniente da primeira espécie não provocou efeitos tóxicos sobre *D. magna* e *O. mykiss* até o seu limite de solubilidade (5 mg/L). Frente à alga *Selenastrum capricornutum*, a dose de 1,7 mg/L foi responsável por 50 % do efeito após 72 h e 96 h e a concentração de efeito não observado (CENO) foi de 0,63 mg/L. Nas mesmas condições, o óleo de *C. lawsoniana* não foi tóxico para *O. mykiss* e *S. capricornutum*. Após 48 h, a CE<sub>50</sub> foi de 1,9 mg/L frente a *D. magna* e 1,25 mg/L; após 72 h, a CENO foi de 1,25 mg/L e, após 96 h, esse valor foi de 0,63 mg/L (DURINGER et al., 2010). A CE<sub>50</sub> observada após 48 h aproximou-se dos achados desse trabalho (1,85 mg/L) e é importante salientar que esses óleos apresentam valor comercial para aplicação como flavorizantes ou fragrâncias, além de ação antifúngica e como repelente de mosquitos e artrópodes (DURINGER et al., 2010).

Em 2006, Hammer e colaboradores descreveram que o óleo de *Malaleuca alternifolia* ou árvore chá, o qual tinha como componentes majoritários o terpinen-4-ol e  $\gamma$ -terpineno, não foi tóxico contra ovos de truta arco-íris até a dose de 1500 partes por milhão (ppm) ou mg/L. Além disso, a cerca de 500 ppm, promoveu a morte de 50 % da população de camarões de alga salgada. Outro dado importante é que as doses letais média frente a *D. magna* de  $p$ -cimeno e  $\alpha$ -pineno foram de 9,4 mg/L e 68 mg/L, respectivamente.

A avaliação da viabilidade celular, após o tratamento dos fibroblastos L 929 com o cinamaldeído (125 a 0,01  $\mu$ g/mL) mostrou que, em concentrações inferiores 1  $\mu$ g/mL, não houve alteração da viabilidade celular ( $p < 0,05$ ). A CI<sub>50</sub> foi de 4,86  $\mu$ g/mL.

Ye e colaboradores (2013) avaliaram a citotoxicidade do cinamaldeído e do carvacrol sobre células, utilizando a linhagem de células Vero. Os autores verificaram CI<sub>10</sub> de 6,3 mg/mL para o cinamaldeído e 12,6 mg/mL para o carvacrol e tais dados

foram considerados consistentes já que canela e orégano são especiarias utilizadas desde a antiguidade.

Chen e colaboradores (2014), ao avaliarem o uso do cinamaldeído no tratamento da incontinência urinária por esforço, utilizando macrófagos murinos RAW 264-7, verificaram que, até 25  $\mu\text{M}$  (3300  $\mu\text{g/mL}$ ), não houve alteração na viabilidade celular. No entanto, os autores observaram significativa redução da viabilidade celular a 50 e 100  $\mu\text{M}$  (6600 e 13200  $\mu\text{g/mL}$ ).

Süloglu e colaboradores (2014) ao avaliarem a viabilidade celular sobre fibroblastos de camundongo L 929 observaram que o novo composto sintetizado, 2,4-ditiofenóxi-1-iodo-4-bromobenzeno e o fluconazol não provocaram redução da viabilidade até 250  $\mu\text{g/mL}$ , após 24 h de incubação.

Maillard e colaboradores (2013) sintetizaram 18 novos derivados hidrazino-1,3-tiazólicos e avaliaram a atividade frente a espécies do gênero *Candida* multirresistentes. Os autores avaliaram ainda a citotoxicidade frente a fibroblastos de camundongo NIH 3T3 e observaram que o composto mais ativo reduziu a viabilidade celular para cerca de 83 % a 0,5  $\mu\text{g/mL}$  e para 69 % a 1  $\mu\text{g/mL}$ .

Zuzarte e colaboradores (2013) ao avaliarem os óleos de *Lavandula stoechas* e *Thymus herba-barona* verificaram que o primeiro não afetou a viabilidade de macrófagos de ratos em concentrações inferiores a 0,64  $\mu\text{L/mL}$  e o segundo, inferiores a 0,04  $\mu\text{L/mL}$ .

Faz-se necessário informar que a anfotericina B, um antifúngico macrolídico poliênico utilizado, principalmente, em infecções invasivas (CAO et al., 2013; HARDMAN, LIMBIRD e GILMAN, 2005) também foi avaliado quanto a sua citotoxicidade por Uribe e colaboradores (2013). Os autores verificaram que a viabilidade celular de miofibroblastos GRX reduziu para 67,2 % com 1,25  $\mu\text{g/mL}$  e para 30,8 % com 2,5  $\mu\text{g/mL}$  do fármaco após 24 h de incubação.

A anfotericina B também foi utilizada nesta tese, como fármaco de referência. Esse antifúngico se liga aos esteróis da membrana fúngica, em especial o ergosterol, levando à formação de poros ou canais, que alteram a permeabilidade seletiva dessa membrana, com conseqüente morte fúngica; mas também pode ocasionar lesão oxidativa das células (BELENKY, CAMACHO e COLLINS, 2013; CAO et al., 2013; HARDMAN, LIMBIRD e GILMAN, 2005). No entanto, Kaminski (2014) enfatizou que essa formação de poros poderia não ser crucial para a atividade desse fármaco e sim a ligação propriamente dita ao ergosterol, sendo que agregados de anfotericina B,

externos à membrana, funcionariam como uma esponja, capaz de retirar esse esteroide da membrana fúngica.

No presente estudo, foi observado ligeiro aumento dos níveis de lipídios neutros, quando *F. oxysporum* ATCC 48112 foi submetido ao tratamento com a anfotericina B. Ao se considerar que os esteróis constituem lipídios neutros das células eucariotas (ALCAZAR-FUOLI e MELLADO, 2013), o modelo da esponja de esteroide citado acima pode ser útil na elucidação do resultado obtido.

O tratamento com cinamaldeído, por outro lado, provocou ligeira redução dos lipídios neutros, o que pode ser justificado pelos estudos de Khan, Ahmad e Cameotra (2013) que mostraram a capacidade desse composto em inibir a biossíntese do ergosterol em *Candida albicans*.

Como mecanismo de ação complementar, Khan, Ahmad e Cameotra (2013) ainda informaram que o cinamaldeído poderia se ligar ao ergosterol e se acumular na membrana, desregular as atividades e acarretar o mau funcionamento das proteínas de membrana e, conseqüente, levar à morte celular.

Os conídios, quando tratados com cinamaldeído, exibiram percentual menor de células viáveis (92,8 %), se comparados com a anfotericina B ou ao controle (98,1 %). Além disso, esse composto promoveu redução de 5,84 % da fluorescência emitida na marcação com sonda, a qual foi, ligeiramente, superior à observada com o tratamento com anfotericina B (3,68 %). Esses dois achados mostram que o cinamaldeído promoveu perturbações na homeostase mitocondrial desse fungo.

Os achados dessa tese reforçaram os resultados de Usta e colaboradores (2002), ao avaliarem o efeito de eugenol e cinamaldeído em fígado de rato, os quais verificaram que o cinamaldeído provocou redução de 50 % do potencial de membrana mitocondrial a 11,6  $\mu\text{mol/mg}$  de proteína e esse efeito pode estar relacionado à ligação a grupos sulfidrila das proteínas de membrana. Além disso, promoveu a estimulação da ATPase e a inibição da redução de NADH ou complexo I da cadeia respiratória, mas sem interferência na atividade de succinato desidrogenase ou complexo II.

O sucesso da terapia antifúngica está relacionado à capacidade do fármaco inibir o crescimento fúngico e penetrar no leito ungueal em concentração suficiente para essa inibição (MONTI et al, 2010). Bhatt e Pillai (2015) consideraram que a baixa tensão superficial da formulação poderia auxiliar na penetração do fármaco. Dessa forma, foi acrescentado o surfactante Tween 80 à formulação desenvolvida, a fim de

promover a solubilização no veículo aquoso e facilitar a entrada do fármaco no sítio acometido.

As formulações de esmaltes disponíveis no mercado, à base de ciclopirox olamina 8 % e amorolfina 5 %, têm seus ativos solubilizados em polímeros vinílicos ou resinas acrílicas insolúveis em água, que formam um filme sobre a unha. No entanto, os solventes orgânicos presentes podem ocasionar irritação da pele ou danificar as unhas (MONTI et al., 2010).

As novas formulações, efinaconazol 10 % e tavaborol 5 % para o tratamento da onicomicose foram elaboradas em veículos aquosos (BHATT e PILLAI, 2015; ELEWSKI et al., 2015) e se mostraram eficazes e, por isso, a suspensão produzida nesta pesquisa também utilizou base aquosa. A placa ungueal comporta-se como um hidrogel e, uma vez hidratada, ocorre seu inchaço e a consequente separação das fibras de queratina, formando poros e permitindo que as moléculas do fármaco possam se difundir mais facilmente (HAFEEZ et al., 2013).

Estudo prévio realizado por Monti e colaboradores (2010) já havia estabelecido que uma formulação de esmalte hidrossolúvel de ciclopirox olamina teve melhor taxa de permeação transungueal. Além disso, a concentração presente no fluido subungueal foi adequada para inibir a maioria dos fungos avaliados, quando comparado à formulação de amorolfina disponível no mercado. A concentração de ativo que permeou o casco bovino inibiu o crescimento fúngico a partir de 2 h de aplicação e esse efeito se manteve até 30 h. Esses autores utilizaram em sua composição hidroxipropil quitosana, álcool etílico, álcool cetosteárilico, acetato de etila em água, essa formulação forma um filme sobre a unha, mas é solúvel em água.

Nessa pesquisa, a formulação promoveu a inibição do crescimento de *C. albicans* e *Fusarium oxysporum* ATCC 48112 a 1 %, correspondendo à concentração de 200,36 µg/mL e *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11481, e *M. gypseum* ATCC 14683 a 0,5 %, correspondendo à concentração de 100,18 µg/mL de cinamaldeído. Da mesma forma, Hafeez e colaboradores (2013) testaram uma formulação com equivalente de cetoconazol de  $206 \pm 8$  µg de cetoconazol, valor esse muito superior à CIM obtida *in vitro*. Na presente tese, a diferença entre os valores obtidos na CIM e no ensaio com a formulação pode se dever ao fato de o ensaio com fungos filamentosos utilizar fragmento fúngico, sem padronização do número de células e ao ativo ter sido solubilizado no meio de cultura sólido. No ensaio com a levedura, o ativo também se encontrava solúvel no meio sólido, o que pode ter reduzido sua atividade.

A avaliação da atividade antifúngica foi importante para estabelecer qual o composto mais ativo, as concentrações capazes de inibir *in vitro* os micro-organismos avaliados e as alterações morfológicas ocasionadas nos mesmos. A avaliação da atividade enzimática e a citometria de fluxo auxiliam na elucidação do mecanismo de ação do composto e os ensaios de toxicidade aguda e viabilidade celular são ferramentas para a avaliação do impacto ambiental provocado por novos fármacos ou da atividade mitocondrial das células após a exposição a um agente.

As análises apontaram o cinamaldeído como composto capaz de interferir na atividade de fosfolipase de *C. albicans*, reduzir a concentração de lipídios neutros, viabilidade celular e atividade mitocondrial de *F. oxysporum*. Foi considerado moderadamente tóxico para microcrustáceos e apresentou  $CI_{50}$  de 4,86  $\mu\text{g/mL}$  de cinamaldeído no ensaio do MTT. A formulação elaborada, com veículo aquoso, foi ativa frente aos fungos avaliados.

A formulação pode ainda ser elaborada com o uso de lipossomas, o que pode promover a redução da toxicidade, aumentar o índice terapêutico do fármaco e reduzir as chances de resistência fúngica pela liberação controlada do ativo (KHAN et al., 2015). Esses achados são promissores e demandam o prosseguimento dos estudos para avaliar a permeação do fármaco e realizar teste *in vivo*.

## 7 CONCLUSÃO

Os ensaios realizados demonstraram o potencial antifúngico do cinamaldeído contra *T. mentagrophytes* ATCC 11481, *T. mentagrophytes* isolado clínico, *F. oxysporum* ATCC 48112, *F. solani* ATCC 36031, *M. canis* ATCC 32903, *M. gypseum* ATCC 14683, *T. rubrum* URM 1666, *E. floccosum* CCF-IOC-3757, *C. albicans* ATCC 10231 e *C. albicans* isolado clínico; sendo mais eficaz que eugenol,  $\alpha$ -metil-*trans*-cinamaldeído e as associações cinamaldeído/eugenol.

A associação entre cinamaldeído e eugenol se mostrou indiferente ou antagonista na maioria dos casos.

Em comparação com os fármacos de referência, cetoconazol, terbinafina e itraconazol, o cinamaldeído foi efetivo contra as espécies *F. oxysporum* ATCC 48112, *F. solani* ATCC 36031 e *E. floccosum* CCF-IOC-3757, que não foram inibidas por esses fármacos. Além disso, foi mais ativo que os fármacos de referência frente a *T. rubrum* URM 1666.

A microscopia eletrônica de varredura mostrou que o composto provocou alterações morfológicas nos fungos filamentosos e levedura, que podem ser indicativas de seu mecanismo de ação.

Em *C. albicans* ATCC 10231, o cinamaldeído provou redução em 5,41 % na atividade de fosfolipase.

Os ensaios de toxicidade aguda apontaram que o cinamaldeído foi considerado moderadamente tóxico à *D. magna*.

Em concentrações iguais ou inferiores a 1  $\mu\text{g/mL}$ , o cinamaldeído não interferiu com a viabilidade de fibroblastos L 929 e a  $\text{IC}_{50}$  observada foi de 4,86  $\mu\text{g/mL}$ .

A citometria de fluxo mostrou que o cinamaldeído promoveu ligeira redução de lipídios neutros e da viabilidade celular e atividade mitocondrial em *F. oxysporum* ATCC 48112, sugerindo que esse composto pode interferir na biossíntese do ergosterol e com a função da mitocôndria fúngica.

A formulação foi preparada com base aquosa e testada em meio de cultura sólido e inibiu as quatro espécies avaliadas.

## 7.1 Perspectivas

Mais testes são necessários para confirmar o mecanismo de ação do cinamaldeído, avaliar a capacidade de permeação da formulação e sua ação *in vivo*.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ELSALAM, K.; KHOKHLOV, A. R. 2015. Eugenol oil nanoemulsion: antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and phytotoxicity on cottonseeds. **Applied Nanoscience**, **5**: 255-265.

ABDELWAHAB, S. I.; MARIOD, A. A.; TAHA, M. M. E.; ZAMAN, F. Q.; ABDELMAGEED, A. H. A.; KHAMIS, S.; SIVASOTHY, Y.; AWANG, K. 2014. **Chemical composition and antioxidant properties of the essential oil of *Cinnamomum altissimum* Kosterm. (Lauraceae)**. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187853521400029X#>> Acesso em 10 agosto 2014.

ADAMS, C.; ATHANASOULA, E.; LEE, W.; MAHAMUDOVA, N.; VLAHOVID T. C. 2015. Environmental and genetic factors on the development of onychomycosis. **J. Fungi**, **1 (2)**: 211-216.

AFFONSO, R. S.; RENNÓ, M. N.; SLANA, G. B. C. A.; FRANÇA, T. C. C.. 2012. Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia. **Revista Virtual de Química**, **4 (2)**: 146-161.

AGBULU, C. O.; IWODI, C.; ONEKUTU, A. 2015. *In vitro* susceptibility test of some antifungal drugs on selected dermatophytes and yeasts isolated from patients attending hospitals in makurdi environ. **Microbiology Journal**, **5 (1)**: 9-16.

AHMAD, A.; KHAN, A.; MANZOOR, N.; KHAN, L. A. 2010. Evolution of ergosterol biosynthesis inhibitors as fungicidal against *Candida*. **Microbial Pathogenesis**, **48**: 35-41.

ALCAZAR-FUOLI, L.; MELLADO, E. Ergosterol biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: its relevance as an antifungal target and role in antifungal drug resistance. 2013. **Frontiers in Microbiology**, **3**: 1-6.

ALEIXO, L. A. 2003. **Análise de variabilidade e obtenção de protoplastos do fungo *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, agente causal da síndrome da morte súbita em soja (*Glycine max* L. Merrill)**. Tese, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 54 p.

ALMEIDA, L. M. M.; SOUZA, E. A. F.; BIANCHIN, D. B.; SVIDZINSKI, T. I. E. 2009. Resposta *in vitro* de fungos agentes de micoses cutâneas frente aos antifúngicos sistêmicos mais utilizados na dermatologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, **84 (3)**: 249-255.

AMALARADJOU, M. A. R.; KIM, K. S.; VENKITANARAYANAN, K. 2014. Sub-inhibitory concentrations of *trans*-cinnamaldehyde attenuate virulence in *Cronobacter sakazakii* *in vitro*. **International Journal of Molecular Science**, **15**: 8639-8655.

AQUINO, V. R.; CONSTANTE, C. C.; BAKOS, L. 2007. Frequência das dermatofitoses em exames micológicos em Hospital Geral de Porto Alegre, Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, **82 (3)**: 239-244.

ARAÚJO, A. J. G.; BASTOS, O. M. P.; SOUZA, M. A. J.; OLIVEIRA, J. C. 2003. Onicomicoses por fungos emergentes: análise clínica, diagnóstico laboratorial e revisão. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, **78 (4)**: 445-455.

ASCENÇÃO, V. L.; FILHO, V. E. M. 2013. Extração, caracterização química e atividade antifúngica de óleo essencial *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia). **Caderno de Pesquisa**, **20**: 137-144.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). 2002. **Água** – Ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia* sp. (Crustacea, Cladocera). ABNT NBR 12713: 2002.

\_\_\_\_\_. 2011. **Ecotoxicidade aquática** – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes. ABNT NBR 15088: 2011.

AZAMBUJA, C. V. A.; KLAFKE, G. B.; PIMMEL, L. A.; XAVIER, M. O. 2014. Onychomycosis: clinical, mycological and in vitro susceptibility testing of isolates of *Trichophyton rubrum*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, **89 (4)**: 581-586.

AZEVEDO, A. P. G. B.; OLIVEIRA, L. G.; RODRIGUES, R. C.; LOUREIRO, I. M. A. L.; FLATSCHART, L. B. 2015. Uso da informação de patentes para estudo dos métodos de avaliação de citotoxicidade in vitro como alternativa ao uso de animais. **Cadernos de Prospecção**, **8 (2)**: 213-221.

BACKES, G. L.; JURSIĆ, B. S.; NEUMANN, D. M. 2015. Potent antimicrobial agents against azole-resistant fungi based on pyridinohydrazide and hydrazomethylpyridine structural motifs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, **23**: 3397-3407.

BADALI, H.; MOHAMMADI, R.; MASHEDI, O.; HOOG, G. S.; MEIS, J. F. 2015. *In vitro* susceptibility patterns of clinically important *Trichophyton* and *Epidermophyton* species against nine antifungal drugs. **Mycoses**, **58**: 303-307.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK D.; IDAOMAR, M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, **46**: 446–475.

BARAN, R.; NAKAMURA, R. Doenças da unha: do diagnóstico ao tratamento. 1 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 272 p.

BARBOSA, L. N. 2010. **Propriedade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares com potencial de uso como conservante em carne e hambúrguer bovino e testes de aceitação**. Dissertação, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 121 p.

BARKMAN, T. J. 2001. Character coding of secondary chemical variation for use in phylogenetic analyses. **Biochemical Systematics and Ecology**, **29**: 1-20.

BARREIRO, E. J.; PINTO, A. C. 2013. Oportunidades e Desafios para a Inovação em Fármacos: Agora ou Nunca. **Revista Virtual de Química**, **5 (6)**: 1059-1074.

BARREIRO, E. J.; KÜMMERLE, A. E.; FRAGA, C. A. M. 2011. The methylation effect in medicinal chemistry. **Chemical Reviews**, **111**: 5215-5246.

BASILE, A. G. 2008. **Desenvolvimento de teste ecotoxicológico com o fungo *Alternaria cassiae*: toxicidade aguda de agrotóxicos e avaliação de risco ambiental**. Dissertação, Universidade Estadual Paulista, 69 p.

BATHIA, R.; SHREAZ, S.; KHAN, N.; MURALIDHAR, S.; BASIR, S. F.; MANZOOR, N.; KHAN, L. A. 2012. Proton pumping ATPase mediated fungicidal activity of two essential oil components. **Journal of Basic Microbiology**, **52**: 504–512.

BELENKY, P.; CAMACHO, D.; COLLINS, J. J. 2013. Fungicidal drugs induce a common oxidative damage cellular death pathway. **Cell Reports**, **3 (2)**: 350-358.

BENADUCCI, T. 2009. **Sensibilidade a antifúngicos sintéticos e naturais anti-*Cryptococcus neoformans* determinados por citometria de fluxo**. Dissertação, Universidade Estadual Paulista, 88 p.

BHATT, V.; PILLAI, R. 2015. Efinaconazole topical solution, 10 %: formulation development program of a new topical treatment of toenail onychomycosis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, **104**: 2177-2182.

BISHOP, A. C.; GANGULY, S.; SOLIS, N. V.; COOLEY, B. M.; JENSEN-SEAMAN, M. I.; FILLER, S. G.; MITCHELL, A. P.; PATTON-VOGT, J. 2013. Glycerophosphocholine utilization by *Candida albicans*: role of the GIT3 transporter in virulence. **The Journal of Biological Chemistry**, **288 (47)**: 33939–33952.

BISOGNO, F.; MASCOTI, L.; SANCHEZ, C.; GARIBOTTO, F.; GIANNINI, F.; KURINA-SANZ, M. ENRIZ, R. 2007. Structure-antifungal activity relationship of cinnamic acid derivatives. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, **55(26)**: 10635-10640.

BRAGA, S. F. P. 2012. **Síntese de inibidores potenciais da tripanotona redutase: base para o desenvolvimento de novos fármacos para tratamento da doença de Chagas e leishmaniose**. Dissertação, Universidade Federal de Minas Gerais, 221 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2016. **Lista A de medicamentos de referência**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/2033ab00409445f3b14cfbf7d85acaec/Lista+A+F%C3%A1rmacos+Isolados+02-08-2013.pdf?MOD=AJPERES>> Acesso em 13 agosto 2014.

\_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. 2016. **Preços máximos de medicamentos por princípio ativo**. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/bdcaed8044\\_d6834a8f4\\_2bfd1b9bead4b/LISTA+CONFORMIDADE\\_2014-07-30.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/bdcaed8044_d6834a8f4_2bfd1b9bead4b/LISTA+CONFORMIDADE_2014-07-30.pdf?MOD=AJPERES)> Acesso em 21 janeiro 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2003. **Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 150, de 17 de junho de 2003**. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/2003/rdc/150\\_03rdc.pdf](http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/2003/rdc/150_03rdc.pdf)> Acesso em: 07 junho 2014.

\_\_\_\_\_. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. 2005. **Resolução nº 357, de 18 de março de 2005**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>> Acesso em: 01 julho 2014.

\_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. 2011. **Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011**. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/port /conama/res/res11/res43011.pdf>> Acesso em 11 julho 2013.

BRAUER, G. M.; MORRIS, R. W.; HOWE, W. B. 1963. Synthesis of Isomers of Eugenol. **Journal of Research of the National Bureau of Standards - A. Physics and Chemistry, 67A (3): 253-257**.

BUSS, D. F.; OLIVEIRA, R. B.; BAPTISTA, D. F. 2008. Monitoramento biológico de ecossistemas aquáticos continentais. **Oecologia Brasiliensis, 12 (3): 355-381**.

CABRERA, M. V. G. 2010. **Conservación de mora, uvilla y frutilla mediante la utilización del aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*)**. Monografía, Escuela de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Ciencias, Escuela Superior Politécnica Chimborazo, Riobamba, Equador, 165 p.

CAFÊU, M. C.; SILVA, G. H.; TELES, H. L.; BOLZANI, V. S.; ARAÚJO, A. R.; YOUNG, M. C. M.; PFENNING, L. H. 2005. Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). **Química Nova, 28 (6): 991-995**.

CALDERON, L. A.; SILVA, L. H. P.; STÁBELI, R. G. 2010. Biodiversidade, infraestrutura universitária e burocracia: os desafios da pesquisa bioprospectiva visando o desenvolvimento sustentado da amazônica legal. **REU. 36 (3): 15-41**.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JR., J. M. 2008. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. **Gazeta Médica da Bahia, 142 (1): 98-106**.

CAMPOS, R. D.; SEO, E. S. M. 2009. Principais aspectos da ecotoxicologia do cloreto vinila. **Interfacehs. 4 (2): 1-16**.

CANESCHI, C. A.; MARTINS, F. J.; LARRUDÉ, D. G.; ROMANI, E. C.; BRANDÃO, M. A. F.; RAPOSO, N. R. B. 2015. *In vitro* antifungal activity of *Baccharis trimera* Less (DC) essential oil against dermatophytes. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 14 (11): 2083-2089**.

CAO, Y. Y.; ZHU, Z. Y.; CHEN, X. F.; YAO, X. W.; ZHAO, L. Y.; WANG, H.; YAN, L.; WU, H. T.; CHAI, Y. F.; JIANG, Y. Y. 2013. Effect of amphotericin B on the metabolic profiles of *Candida albicans*. **Journal of Proteome Research, 2013 (12): 2921-2932**.

CASTRO, L. A. S. 2002. **Processamento de amostras para microscopia eletrônica de varredura**. 1 ed. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 37 p.

CHAVES, L. J. Q. 2007. **Dermatomicoses em cães e gatos: avaliação do diagnóstico clínico-laboratorial e dos aspectos epidemiológicos em uma população de portadores de lesões alopecicas circulares**. Dissertação, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 85 p.

CHEN, Y.-H.; LIN, Y.-N.; CHEN, W.-C.; HSIEH, W.-T.; CHEN, W.-Y. 2014. Treatment of stress urinary incontinence by cinnamaldehyde, the major constituent of the chinese medicinal herb *Ramulus cinnamomi*. **BioMed Research International**, **2014**: 1-10.

CHENG, S.-S.; CHUNG, M.-J.; CHEN, Y.-J.; CHANG, S.-T. 2011. Antipathogenic Activities and Chemical Composition of *Cinnamomum osmophloeum* and *Cinnamomum zeylanicum* leaf essential Oils. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, **31**: 73–87.

CHENG, S.-S.; LIU, J.-Y.; CHANG, E.-H.; CHANG, S.-T.. 2008. Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. **Bioresource Technology**, **99**: 5145-5149.

CHOUHAN, P.; SAINI, T. R. 2012. Hydration of nail plate: A novel screening model for transungual drug permeation enhancers. **International Journal of Pharmaceutics**, **436**: 179-182.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). 2002. **M27-A2**. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing os Yeasts; Approved Standar - Second Edition, v. 22, n. 15. 51p.

CLSI. 2002. **M38-A**. Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica dos fungos filamentosos: norma aprovada, v. 22, n. 16. 50p.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). 2008. **M38-A2**. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing filamentous fungi; approved standard – Second edition, v. 28, n. 16. 52 p.

COLEMAN, N. W.; FLECKMAN, P.; HUANG, J. I. 2014. Fungal nail infections. **The Journal of Hand Surgery**, **39 (5)**: 985-988.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (CEC). 1996. **Technical guidance document in support of commission directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances**. Part II, environmental risk assessment. Luxemburg: Office for official publication of the European Communities. 337 p.

CORTÉS-ROJAS, D. F.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. 2014. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, **4 (2)**: 90-96.

COSTA, C. B. 2008. **Dermatofitoses**: gêneros, principais espécies antropofílicas, diagnóstico laboratorial e tratamento. Monografia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 54 p.

COSTA, M.; PASSOS, X. S.; HASIMOTO E SOUZA, L. K.; MIRANDA, T. B.; LEMOS, J. A.; OLIVEIRA JÚNIOR, J. G.; SILVA, M. R. R. Epidemiologia e etiologia das dermatofitoses em Goiânia, GO, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **35 (1)**: 19-22.

CZELUSNIAK, K. E.; BROCCO, A.; PEREIRA, D. F.; FREITAS, G. B. L. 2012. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, **14 (2)**: 400-409.

DARVISH, E.; OMIDI, M.; BUSHEHRI, A. A. S.; GOLSHANI, A.; SMITH, M. L. 2013. The antifungal eugenol perturbs dual aromatic and branched-chain amino acid permeases in the cytoplasmic membrane of yeast. **Plos One**, **8 (10)**: 1-9.

DAVID, R. M.; JONES, H. S.; PANTER, G. H.; WINTER, M. J.; HUTCHINSON, T. H.; CHIPMAN, J. K. 2012. Interference with xenobiotic metabolic activity by the commonly used vehicle solvents dimethylsulfoxide and methanol in *zebrafish* (*Danio rerio*) larvae but not *Daphnia magna*. **Chemosphere**, **88 (8)**: 912–917.

DE PAULA, S. B.; BARTELLI, T. F.; DI RAIMO, V.; SANTOS, J. P.; MOREY, A. T.; BOSINI, M. A.; NAKAMURA, C. V.; YAMAYCHI, L. M.; YAMADA-OGATTA, S. F. 2014. Effect of eugenol on cell surface hydrophobicity, adhesion, and biofilm of *Candida tropicalis* and *Candida dubliniensis* isolated from oral cavity of HIV-infected patients. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, **2014**: 1-8.

DEARLOVE, R. P.; GREENSPAN, P.; HARTLE, K. D.; SWANSON, R. B.; GARGROVE, J. L. 2008. Inhibition of protein glycation by extracts of culinary herbs and spices. **Journal of Medicinal Food**, **11 (2)**: 275-281.

DEBOURGOGNE, A.; HOOG, S.; LOZNIEWSKI, A.; MACHOUART, M. 2011. Amphotericin B and voriconazole susceptibility profiles for the *Fusarium solani* species complex: comparison between the E-test and CLSI M38-A2 microdilution methodology. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, **31(4)**: 615-618.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. 2007. **Microscopia eletrônica de varredura**: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. Porto Alegre: EDIPUCRS, 60 p.

DELARZE, E.; SANGLARD, D. 2015. Defining the frontiers between antifungal resistance, tolerance and the concept of persistence. **Drug Resistance Updates**, **23**: 12-19.

DELL ROSSO, J. Q. 2014. The role of topical antifungal therapy for onychomycosis and the emergence of newer agents. **The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, **7 (7)**: 10-18.

- DIOGO, H. C.; MELHEM, M.; SARPIERI, AL.; PIRES, M. C. Avaliação do método de disco-difusão para determinação da eficácia da terbinafina in vitro em agentes de micoses superficiais e subcutâneas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, **85 (3)**: 324-330.
- DROUOT, S.; MIGNON, B.; FRATTI, M.; ROOSJE, P.; MONOD, M. 2008. Pets as the main source of two zoonotic species of the *Trichophyton mentagrophytes* complex in Switzerland, *Arthroderma vanbreuseghemii* and *Arthroderma benhamiae*. **Veterinary Dermatology**, **20 (1)**: 13-18.
- DUARTE, L. C.; JUCHEM, P. L.; PULZ, G. M.; BRUM, T. M. M.; CHODUR, N.; LICCARDO, A.; FISCHER, A. C.; ACAUAN, R. B. 2003. Aplicações de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS) no Estudo de Gemas: exemplos brasileiros. **Pesquisas em Geociências**, **30 (2)**: 3-15.
- DURINGER, J. M.; SWAN, L. R.; WALKER, D. B.; CRAIG, A. M. 2010. Acute aquatic toxicity of western juniper (*Juniperus occidentalis*) foliage and Port Orford cedar (*Chamaecyparis lawsoniana*) heartwood oils. **Environmental Monitoring and Assessment**, **170**: 585–598.
- EKROOS, M.; SJÖGREN, T. 2006. Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **103 (37)**: 13682-13687.
- ELEWSKI, B. E.; RAZA, A.; BALDWIN, S. L.; SOTO, R. F. G.; RICHI, P.; WEISFELD, M.; WILTZ, H.; ZANE, L. T.; POLLAK, R. 2015. Efficacy and safety of tavaborole topical solution, 5 %, a novel boron-based antifungal agent, for the treatment of toenail onychomycosis: results from 2 randomized phase-III studies. **Journal of American Academy of Dermatology**, **73 (1)**: 63-69.
- ELKEEB, R.; ALIKHAN, A.; ELKEEB, L.; HUI, X.; MAIBACH, H. I. 2010. Transungual drug delivery: current status. **International Journal of Pharmaceutics**, **384**: 1–8.
- ENE, I. V.; WALKER, L. A.; SCHIAVONE, M.; LEE, K. K.; MARTIN-YKEN, H.; DAGUE, E.; GROW, N. A. R.; MUNRO, C. A.; BROWN, A. J. P. 2015. Cell wall remodeling enzymes modulate fungal cell wall elasticity and osmotic stress resistance. **Mbio**, **6 (4)**: 1-15.
- ETHUR, L. Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M. F. B.; FLORES, M. G. V. 2007. Seleção de antagonistas fúngicos a *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* em substrato comercial para mudas. **Ciencia Rural**, **37 (6)**: 1794-1797.
- FAIKOH, E. N.; HONG, Y.-H.; HU, S.-Y. 2014. Liposome-encapsulated cinnamaldehyde enhances zebrafish (*Danio rerio*) immunity and survival when challenged with *Vibrio vulnificus* and *Streptococcus agalactiae*. **Fish & Shellfish Immunology**, **38**: 15-24.
- FENNER, R.; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A.; RATES, S. M. K. 2006. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, **42 (3)**: 369-394.

FERNANDES, M. H. V.; SILVA, D. S.; CASTRO, C. C.; CORRÊA, R. A.; VARGAS, G. A.; FISCHER, G.; MOTTA, A. S.; HÜBNER, S. O. 2013. Avaliação da citotoxicidade do peptídeo antimicrobiano P34. **Science and Animal Health**, **1 (1)**: 2-10.

FILHO, J. E. S.; RODRIGUES, S. S. F. B. 2012. Prospecção tecnológica do uso do óleo essencial de cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*) e do eugenol na formulação de produtos para higiene pessoal, alimentos e medicamentos. **Cadernos de Prospecção**, **5 (3)**: 152-158.

FLAMBÓ, D. F. A. L. P. 2013. **Atividades biológicas dos flavonoides: atividade antimicrobiana**. Dissertação, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal, 43 p.

FLORES, F. C.; BECK, R. C. R.; SILVA, C. B. 2016. **Mycopathologia**, **181**: 9-15.

FONSECA, R. G. C.; CLEMENTE, R. G.; OLIVEIRA, A. R. 2012. Avaliação de práticas de gestão do conhecimento adotadas em novos empreendimentos de base tecnológica. **Revista de Gestão e Operações Produtivas**, **3 (1)**: 1-12.

FONTENELLE, R. O. S.; MORAIS, S. M.; BRITO, E. H. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; LIMA, Y. C.; BRASIL, N. V. G. P. S.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. 2011. Alkylphenol activity against *Candida* spp. and *Microsporium canis*: a focus on the antifungal activity of thymol, eugenol and o-methyl derivatives. **Molecules**, **16**: 6422-6431.

FOURIE, G. STEENKAMP, E. T.; PLOETZ, R. C.; GORDON, T. R.; VILJOEN, A. 2011. Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* formae specialis cubense within the *Fusarium oxysporum* complex. **Infection, Genetics and Evolution**, **11**: 533-542.

FRANÇA, R. R. F.; CARVALHO, A. S.; BRANCO, F. S. C.; PINTO, A. C.; BOECHAT, N. 2014. Inibidores potentes da enzima esterol 14- $\alpha$ -desmetilase contra *Tripanosoma cruzi*. **Revista Virtual de Química**, **6 (5)**: 1483-1516.

FREIESLEBEN, S. H.; JÄGER, A. K. 2014. Correlation between plant secondary metabolites and their antifungal mechanisms – a review. **Medicinal & Aromatic Plants**, **3 (2)**: 1-6.

GALIZA, G. J. N.; SILVA, T. M.; CAPRIOLI, R. A.; BARROS, C. S. L.; IRIGOYEN, L. F.; FIGHERA, R. A.; LOVATO, M.; KOMMERS, G. D. 2014. Ocorrência de micoses e pitiose em animais domésticos: 230 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, **34 (3)**: 224-232.

GALLETI, S. R. 2003. Introdução à microscopia eletrônica. **Biológico**, **65 (1/2)**: 33-35.

GARCÍA, A. A.; CARRIL, E. P.-U. 2009. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca (Biologia)**. **Série Fisiologia Vegetal**, **2 (3)**: 119-145.

GHANNOUM, M.; ISHAM, N. 2014. Fungal nail infections (onychomycosis): a never-ending story? **Plos Pathogens**, **10 (6)**: 1-5.

GHANNOUM, M.; ISHAM, N.; CATALANO, V. 2014. A second look at efficacy criteria for onychomycosis: clinical and mycological cure. **British Journal of Dermatology**, **170**: 182-187.

GHELARDI, E.; CELANDRONI, F.; GUEYE, S. A.; SALVETTI, S.; SENESI, S.; BULGHERONI, A.; MAILLAND, F. 2014. Potential of ergosterol synthesis inhibitors to cause resistance or cross-resistance in *Trichophyton rubrum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **58 (5)**: 2825-2829.

GIUDICE, C. M. 2008. **Avaliação das atividades enzimáticas (queratinase e elastase) e biotipagem molecular de amostras de *Microsporium gypseum* isolados de diferentes fontes e regiões geográficas do Brasil**. Tese, Universidade de São Paulo, São Paulo, 119p.

GIUDICE, C. M.; REIS-MENEZES, A. A.; RITTNER, G. M. G.; MOTA, A. J.; GAMBALÉ, W. 2012. Isolation of *Mycrosporium gypseum* in soil samples from different geographical regions of Brazil, evaluation of the extracellular proteolytic enzymes activities (keratinase and elastase) and molecular sequencing of selected strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, **43 (3)**: 895-902.

GOMES, S.; LENCASTRE, A.; LOPES, M. J. P. 2012. Alterações ungueais em Pediatria. **Nascer e Crescer**, **21 (1)**: 19-24. Disponível em <[http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0872-07542012000100004&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0872-07542012000100004&lng=pt&nrm=iso)>. acessos em 15 maio 2016. 19-24.

GONG, L.; LI T.; CHEN, F.; DUAN, X.; YUAN, Y.; ZHANG, D.; JIANG, Y. 2016. A inclusion complex of eugenol into  $\beta$ -ciclodextrin: preparation and physicochemical and antifungal characterization. **Food Chemistry**, **196**: 324-330.

GONZÁLEZ-ORTEGON, E.; BLASCO, J.; VAY, L. L.; GIMENEZ, L. 2013. A multiple stressor approach to study the toxicity and sub-lethal effects of pharmaceutical compounds on the larval development of a marine invertebrate. **Journal of Hazardous Materials**, **263P**: 233–238.

GULÇİN, I. 2011. Antioxidant activity of eugenol: a structure–activity relationship study. **Journal of Medicinal Food**, **14 (9)**: 975–985.

GUPTA, A. K.; ELEWSKI, B. E.; SUGARMAN, J. L.; IEDA, C.; KAWABATA, H.; KANG, R.; PILLAI, R.; OLIN, J. T.; WATANABE, S. 2014. The efficacy and safety of efinaconazole 10 % solution for treatment of mild to moderate onychomycosis: a pooled analysis of two phase 3 randomized trials. **Journal of Drugs in Dermatology**, **13 (7)**: 815-820.

GUPTA, A. K.; PAQUET, M. 2013. Improved efficacy in onychomycosis therapy. **Clinics in Dermatology**, **31**: 555–563.

GUPTA, D.; JAIN, D. K. 2015. Chalcone derivatives as potential antifungal agents: synthesis, and antifungal activity. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, **6 (3)**: 114-117.

GUTMANN, B.; ELSNER, P.; GLASNOV, T.; ROBERGE, D. M.; KAPPE, C. O. 2014. Shifting chemical equilibria in flow-efficient decarbonylation driven by annular flow regimes. **Angewandte Chemie International**, **53**: 1-6.

HAFEEZ, F.; HUI, X.; CHIANG, A. HORNBY, S.; MAIBACH, H. Transungual delivery of ketoconazole using novel lacquer formulation. **International Journal of Pharmaceutics**, **456**: 357-361.

HALM-LEMEILLE, M.-P.; FARD, E. A.; LATIRE, T.; COSTIL, J.-C. F. K.; LEBEL, J.-M.; BUREAU, R.; SERPENTINI, A. 2014. The effect of different polychlorinated biphenyls on two aquatic models, the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* and the haemocytes from the European abalone *Haliotis tuberculata*. **Chemosphere**, **110**: 120–128.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V.; NIELSEN, J. B. 2006. A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Food and Chemical Toxicology**, **44**: 616–625.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. (Ed.). 2005. **Goodman & Gilman**. As bases farmacológicas da terapêutica. Tradução para o português: Carla de Mello Vorsatz et al. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 1615p.

HARRIS, L-A. L. S.; SKINNER, J. R.; WOLINS, N. E. 2013. Imaging of neutral lipids and neutral lipid associated proteins. **Methods Cell Biology**, **116**: 1-12.

HUBKA, V.; DOBIÁSOVÁ, S.; DOBIÁS, R.; KOLARÍK, M. 2014. *Microsporium aenigmaticum* sp. nov. from *Microsporium gypseum* complex isolated as a cause of *tinea corporis*. **Medical Mycology**, **52 (4)**: 387-396.

IWATA, A.; WATANABE, Y.; KUMAGAI, N.; KATAFUCHI-NAGASHIMA, M.; SUGIURA, K.; RADHAKRISHNAN, P.; TATSUMI, Y. 2014. In vitro and in vivo assessment of dermatophyte acquired to efinaconazole, a novel triazole antifungal. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **58 (8)**: 4920-4922.

JAGANATHAN, S. K.; MAZUMDAR, A.; MONDHE, D.; MANDAL, M. 2011. Apoptotic effect of eugenol in human colon cancer cell lines. **Cell Biology International**, **35**: 607–615.

JHAM, G. N.; DHINGRA, O. D.; JARDIM, C. M.; VALENTE, V. M. M. 2005. Identification of the major fungitoxic component of cinnamon bark oil. **Fitopatologia Brasileira**, **30 (4)**: 404-408.

JOSEPH, B.; SUJATHA, F. 2012. Bioactive compounds and its autochthonous microbial activities of extract and clove oil (*Syzygium aromaticum* L.) on some food borne pathogens. **Asian Journal of Biological Sciences**, **4 (1)**: 35-43.

KAMINSKI, D. M. 2014. Recent progress in the study of the interactions of amphotericin B with cholesterol and ergosterol in lipid environments. **European Biophysics Journal**, **43**: 453-467.

KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIK, M.; KOZIK, A. 2009. Fungi pathogenic to humans: molecular basis of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta Biochimica Polonica**, **56 (2)**: 211-224.

KARMAKAR, S.; CHOUDHURY, M.; DAS, A. S.; MAITI, A.; MAJUMDAR, S.; MITRA, C. 2012. Clove (*Syzygium aromaticum* Linn) extract rich in eugenol and eugenol derivatives shows bone-preserving efficacy. **Natural Product Research**, **26 (6)**: 500–509.

KAVANAGH, K. (Ed.). 2005. **Fungi: Biology and Applications**. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd. 293 p.

KHAN, M. A.; ALJARBOU, A. N.; KHAN, A.; YOUNUS, H. 2015. Liposomal thymoquinone effectively combats fluconazole-resistant *Candida albicans* in a murine model. **International Journal of Biological Macromolecules**, **76**: 203-208.

KHAN, M. S. A.; AHMAD, I. 2011. Antifungal activity of essential oils and their synergy with fluconazole against drug-resistant strains of *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **90**: 1083–1094.

KHAN, M. S. A.; AHMAD, I.; CAMEOTRA, S. S. 2013. Phenyl aldehyde and propanoids exert multiple sites of action towards cell membrane and cell wall targeting ergosterol in *Candida albicans*. **AMB Express**, **3 (54)**: 1-16.

KHAN, N.; SHREAZ, S.; BHATIA, R.; AHMAD, S. I.; MURALIDHAR, S.; MANZOOR, N.; KHAN, L. A. 2012. Anticandidal activity of curcumin and methyl cinnamaldehyde. **Fitoterapia**, **83**: 434-440.

KIM, I.; WON, H. K.; CHOI, J.; LEE, G. H. 2007. A novel and efficient approach to highly substituted indolizines via 5-endo-trig iodocyclization. **Tetrahedron**, **63**: 12954-12960.

KIM, J. H.; CHAN, K. L.; MAHONEY, N.; CAMPBELL, B. C. 2011. Antifungal activity of redox-active benzaldehydes that target cellular antioxidation. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, **10 (23)**: 1-16.

KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; MINTER, D. W.; STALPERS, J. A. 2008. **Dictionary of the Fungi**. 10 ed. Wallingford: CAB International, 84p.

KOLEVA, Y. K.; MADDEN, J. C.; CRONIN, M. T. D. 2008. Formation of categories from structure-activity relationships to allow read-across for risk assessment: toxicity of  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl compounds. **Chemical Research in Toxicology**, **21**: 2300–2312.

KONG, J-O.; LEE, S-M.; MOON, Y-S.; LEE, S-G.; AHN, Y-J.; 2007. Nematicidal activity of cassia and cinnamon oil compounds and related compounds toward *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Parasitaphelenchidae). **The Journal of Nematology**, **39 (1)**: 31–36.

KOROSEC, B.; SOVA, M.; TURK, S.; KRASEVEC, N.; NOVAK, M.; LAH, L.; STOJAN, J.; PODOBNIK, B.; BERNE, S.; ZUPANEC, N.; BUNC, M.; GOBEC, S.; KOMEL, R. 2013. Antifungal activity of cinnamic acid derivatives involves inhibition of benzoate 4-hydroxylase (CYP53). **Journal of Applied Microbiology**, **116**: 955-966.

KUMAR, T. P.; RAJU, P. N. 2013. Transungual drug delivery: a promising route to treat nail disorders. **International Journal of Pharma Research & Review**, **2 (4)**: 22-33.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. 2002. **Tratado de Micologia Médica**. São Paulo: Sarvier, 1104 p.

LASENNA, C. E.; TOSTI, E. 2015. Patient considerations in the management of toe onychomycosis - role of efinaconazole. **Patient Preference and Adherence**, **9**: 887-891.

LATGÉ, J-P. 2007. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. **Molecular Microbiology**, **66 (2)**: 279-290.

LEE, S. C.; LEE, C. H.; LIN, M. Y.; HO, K. Y. 2010. Genetic identification of *Cinnamomum* species based on partial internal transcribed spacer 2 of ribosomal DNA. **Journal of Food and Drug Analysis**, **18 (4)**: 225-231.

LEE, S-J.; HAN, J-I. LEE, G-S.; PARK, M-J.; CHOI, I-G.; NA, K-J.; JEUNG, E-B. 2007. Antifungal effect of eugenol and nerolidol against *Microsporium gypseum* in a guinea pig model. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, **30 (1)**: 184-188.

LEITE, L. C.; PEREIRA, C. D. S.; VICENTE, S. J. V.; CORTEZ, F. S.; PUSCEDDU, F. H. 2012. Avaliação ecotoxicológica de compostos fenólicos em ambientes marinhos. **Unisanta Bioscience**, **1 (2)**: 76-81.

LI, Z-H.; LI, P.; HANDAK, T. 2010. Ecotoxicological effects of short-term exposure to a human pharmaceutical verapamil in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, **152**: 385-391.

LIM, C. S.-Y.; ROSLI, R.; SEOW, H. F.; CHONG, P. P. 2012. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, **31**: 21-31.

LIM, E.-H.; KIM, H.; PARK, Y.-O.; LEE, Y.; SEO, Y.-Y.; KIM, C.-D.; LEE, J.-H.; IM, M. 2014. Toenail onychomycosis treated with a fractional carbon-dioxide laser and topical antifungal cream. **Journal of the American Academy of Dermatology**, **70 (5)**: 918-923.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. 2006. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, **16 (2)**: 197-201.

- LIMA, M. M.; LANZA, P.; CERMEÑO, J.; HERNÁNDEZ, I.; PÑRUA, J. 2011. Dermatomicosis en ancianos institucionalizados y estudio de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos sistémicos. **Gaceta Médica de Caracas**, **119 (3)**: 207-212.
- LIMA, K. M.; RÊGO, R. S. M.; DELGADO, M.; CASTRO, C. M. M. B. 2009. Espécies e susceptibilidade antifúngica *in vitro* de leveduras isoladas em unhas de pacientes com vírus da imunodeficiência humana. **Revista de Ciências Médicas**, **18 (2)**: 89-97.
- LIMA, L. P.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, T. M. D.; FERNANDES, C. S. 2005. Constituintes voláteis das folhas e dos galhos de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). **Acta Amazonica**, **35 (3)**: 363-366.
- LOGUERCIO-LEITE, C.; GROPOSO, C.; DRESCHLER-SANTOS, E. R.; FIGUEIREDO, N. F.; GODINHO, P. S.; ABRÃO, R. L. 2006. A particularidade de ser um fungo – I. constituintes celulares. **Biotemas**, **19 (2)**: 17-27.
- LONGO, D. L. 2013. **Avaliação da citotoxicidade e expressão de citocinas induzida por resina composta fotopolimerizável**. Dissertação, Universidade de São Paulo, 91 p.
- LOPES, F. A.; SOARES, N. F. F.; LOPES, C. C. P.; SILVA, W. A. 2014. Desenvolvimento e caracterização de filmes de base celulósica incorporados com aldeído cinâmico. **Brazilian Journal of Food Technology**, **17 (1)**: 33-40.
- LU, T.,-J.; LIM, C.-K. 2008. Asymmetric Synthesis of  $\alpha$ -Amino Acids: Preparation and Alkylation of Monocyclic Iminolactones Derived from  $\alpha$ -Methyl *trans*-Cinnamaldehyde. **The Journal of Organic Chemistry**, **73 (24)**: 9527-9534.
- MACÊDO, D. P. C.; NEVES, R. P.; LOPES, F. C. 2008. Case report: disseminated dermatophytosis by *Microsporium gypseum* in a systemic lupus erythematosus patient. **Brazilian Journal of Microbiology**, **39 (1)**: 25-27.
- MACHADO JÚNIOR, J. C. M.; FLORÃO, A.; MATTANA, F. V. R.; ROCHA, F. H.; SANTOS, C. A. M.; WEFFORT-SANTOS, A. M. A citometria de fluxo como instrumento de avaliação da atividade imunomodulatória de extratos e substâncias isoladas de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **16 (Supl)**: 645-655.
- MADRID, I. M.; GOMES, A. R.; MATTEI, A. S.; SANTIN, R.; CLEFF, M. B.; FARIA, R. O.; MEIRELES, M. C. A. 2012. Dermatofitose neonatal canina por *Microsporium gypseum*. **Veterinária e Zootecnia**, **19 (1)**: 73-78.
- MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. 2008. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, **12 (3)**: 355-381.
- MAHMOUDABADI, A. Z.; ZARRIN, M.; MIRY, S. 2010. Phospholipase activity of *Candida albicans* isolated from vagina and urine samples. **Jundishapur Journal of Microbiology**, **3 (4)**: 169-173.

MAILLARD, L. T.; BERTOUT, S.; QUINONÉRO, O.; AKALIN, G.; TURAN-ZITOUNI, G.; FULCRAND, P.; DEMIRCI, F.; MARTINEZ, J.; MASURIER, N. 2013. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, **23**: 1803-1807.

MAKIMURA, K.; MOCHIZUKI, T.; HASEGAWA, A.; UCHIDA, K.; SAITO, H.; YAMAGUCHI, H. 1998. **Journal of Clinical Microbiology**, **36 (9)**: 2629-2633.

MANFRINI, R. N. 2007. **Síntese de derivados de *n*-acetilglicosamina e investigação de sua atividade antimicrobiana**. Tese, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 149 p.

MANNHEIMER, W. A. 2002. **Microscopia dos materiais**. Rio de Janeiro: E-paper Serviços Editoriais, 221 p.

MANRIQUE, W. G. 2009. **Toxicidade aguda, risco ambiental do fipronil para o guarú (*Poecilia reticulata*) e dissipação no ambiente aquático**. Dissertação, Universidade Estadual Paulista, 56 p.

MARCONE, G. P. S. 2011. **Asymmetric synthesis of *r*-amino acids: preparation and alkylation of monocyclic iminolactones derived from *r*-methyl *trans*-cinnamaldehyde**. Tese, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 207 p.

MARQUES, C. A., BARROS, C. F., COSTA, C. G. 2004. *Beilschmiedia rigida* (Mez) Kosterm. (Lauraceae): diferenciação e desenvolvimento da lâmina foliar. **Rodriguésia**, **55 (84)**: 89-100.

MARTELOZO, I. C.; GUILHERMETTI, E.; SVIDZINSKI, T. I. E. 2005. Ocorrência de onicomiose em Maringá, Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum Health Science**, **27 (2)**: 177-182.

MARTÍNEZ, E.; AMEEN, M.; TEJADA, D.; ARENAS, R. 2013. *Microsporium* spp. onychomycosis: disease presentation, risk factors and treatment responses in an urban population. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, **18 (2)**: 181-186.

MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N.; ROSSI, A. 2008. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia**, **166**: 369-383.

MASELLI, B. S.; LUNA, L. A. V.; PALMEIRA, J. O.; BARBOSA, S.; BEIJO, L. A.; UMBUZEIRO, G. A.; KUMMROW, F. 2013. Ecotoxicidade de efluentes brutos e tratados gerados por uma fábrica de medicamentos veterinários. **Revista Ambiente & Água**, **8 (2)**: 168-179.

MATAN, N.; MATAN, N. 2007. Effect of combined cinnamon and clove oil against major moulds identified from rubberwood (*Hevea brasiliensis*). **Walailak Journal of Science and Technology**, **4 (2)**: 165-174.

MICHIELSE, C. B.; REP, M. 2009. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. **Molecular Plant Pathology**, **10 (3)**: 311-324.

MIHALI, C. V.; BURUIANA, A.; TURCUS, V.; COVACI, A.; ARDELEAN, A. 2012. Comparative studies of morphology and ultrastructure in two common species of dermatophytes: *Microsporium canis* and *Microsporium gypseum*. **Annals of the Romanian Society for Cell Biology, XVII (1): 85-89.**

MIRANDA, R. B. 2007. **Citotoxicidade de alguns cimentos reparadores de perfuração radicular sobre células L 929.** Dissertação, Universidade do Grande Rio, 107 p.

MONTAGNER, C. 2007. **Atividades antifúngica, citotóxica (células tumorais humanas) e hemolítica de cumarinas naturais e semi-sintéticas.** Dissertação, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 126 p.

MONTEIRO, C. M.; MARTINS, C. J.; MONTEIRO, C. S.; PAIVA, M. B. M.; FAGUNDES, R. O. 2003. Kerion celsi por *Microsporium gypseum*. **Anais Brasileiros de Dermatologia, 78 (3): 319-321.**

MONTI, D.; SACCOMANI, L.; CHETONI, P.; BURGALASSI, S.; SENESI, S.; GHELARDI, E.; MAILLAND, F. 2010. Hydrosoluble medicated nail lacquers: *in vitro* drug permeation and corresponding antimycotic activity. **British Journal of Dermatology, 162: 311-317.**

MORAES, A. M. L.; PAES, R. A.; HOLANDA, V. L. 2009. Micologia. *In*: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. 2009. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde.** Volume 1. Rio de Janeiro: EPSJV, IOC, 290 p.

MORAIS, O. O. 2013. **Avaliação da eficácia do laser erbium-doped yttrium aluminium garnet (Er: Yag) associado ao esmalte de amorolfina no tratamento da onicomicose: estudo pareado e randomizado.** Dissertação, Universidade de Brasília, 90 p.

MORALES, B. P. 2009. **Suscetibilidade in vitro de Cryptococcus neoformans e Cryptococcus gattii frente a drogas antifúngicas pela citometria de fluxo.** Dissertação, Fundação Oswaldo Cruz, 60 p.

MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods, 65 (1-2): 55-63.**

MOUTINHO, M. F. 2013. **Ecotoxicidade comparativa dos herbicidas da cana-de-açúcar para larvas de anfíbios.** Dissertação, Universidade de São Paulo, São Paulo, 118 p.

MUHSIN, T. M.; AUBAID, A. H.; AL-DUBOON, A. H. 1997. Extracellular enzyme activities of dermatophytes and yeast isolates on solid media. **Mycoses, 40 (11-12): 465-469.**

MÜLLER, C.; STAUDACHER, V.; KRAUSS, J.; GIERA, M.; BRACHER, F. 2013. A convenient cellular assay for the identification of the molecular target of ergosterol biosynthesis inhibitors and quantification of their effects on total ergosterol biosynthesis. **Steroids**, **78**: 483-493.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. 2004. **Microbiologia médica**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan S. A., 762 p.

NAKAGE, A. P. M.; SANTANA, A. E.; CÁPUA, M. L. B.; COELHO, P. S. 2005. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciência Rural**, **35** (4): 966-973.

NASERI, A.; FATA, A.; NAJAFZADEH, M. J.; SHOKRI, H. 2013. Surveillance of dermatophytosis in northeast of Iran (Mashhad) and review of published studies. **Mycopathologia**, **176**: 247-253.

NAIR, A. B.; KIM, H. D.; CHAKRABORTY, B.; SINGH, J.; ZAMAN, M.; GUPTA, A.; FRIDEN, P. M.; MURTHY, S. N. 2009. Ungual and trans-ungual iontophoretic delivery of terbinafine for the treatment of onychomycosis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, **98** (11): 4130-4140.

NASIR, M. 2010. **The antimicrobial effect of essential oils on dermatophytes**. Dissertação, Addis Ababa University, Etiópia, 71 p.

NATARAJAN, V.; VENUGOPAL, P. V.; MENON, T. 2003. Efeito da *Azadirachta indica* (NIN) sobre o crescimento padrão de dermatófitos. **Revista Brasileira de Microbiologia Médica**, **21** (2): 98-101.

NATH, S. C.; BARUAH, A.; KANJILAL, P. B. 2006. Chemical composition of the leaf essential oil of *Cinnamomum pauciflorum* Nees. **Flavour and Fragrance Journal**, **21**: 531-533.

NEGRI, M.; SALCI, T. P.; SHINOBU-MESQUITA, C. S.; CAPOCI, I. R. G.; SVIDIZINSKI, T. I. E.; KIOSHIMA, E. S. 2014. Early state research on antifungal natural products. **Molecules**, **19**: 2925-2956.

NEGRONI, R. 2008. Tratamento de las onicomicosis. **Revista de Patologia Tropical**, **37** (2): 89-109.

NORDQVIST, A.; BJÖKELID, C.; ANDALOUSSI, M.; JANSSON, A. M.; MOWBRAY, S. L.; KARLÉN, A.; LARHED, M. 2011. Synthesis of functionalized cinnamaldehyde derivatives by an oxidative Heck reaction and their use as starting materials for preparation of *Mycobacterium tuberculosis* 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase inhibitors. **The Journal of Organic Chemistry**, **76** (21): 8986-8998.

NOSTRO, A.; SCAFFARO, R.; D'ARRIGO, M.; BOTTA, L.; FILOCAMO, A.; MARINO, A.; BISIGNANO, G. 2012. Study on carvacrol and cinnamaldehyde polymeric films: mechanical properties, release kinetics and antibacterial and antibiofilm activities. **Applied Microbial and Cell Physiology**, **96**: 1029-1038.

NUNES, B. 2010. Fármacos no ambiente: implicações ecotoxicológicas. **CAPTAR**, **2 (1)**: 9-20.

NYAMUNDA, B. C.; MOYO, M.; FIDELIS, C.; ; 2012. Catalytic oxidation of cinnamyl alcohol to cinnamaldehyde using hydrogen peroxide. **Engineering Science and Technology: An International Journal**, **2 (3)**: 414-420.

OOTANI, M. A.; AGUIAR, R. W.; RAMOS, A. C. C.; BRITO, D. R.; SILVA, J. B.; CAJAZEIRA, J. P. 2013. Use of Essential Oils in Agriculture. **Jornal of Biotechnology and Biodiversity**, **4 (2)**: 162-174.

PAGIOTTI, R.; ANGELINI, P.; RUBINI, A.; TIRILLINI, B.; GRANETTI, B.; VENANZONI, R. 2011. Identification and characterization of human pathogenic filamentous fungi and susceptibility to *Thymus schimperi* essential oil. **Mycoses**, **54**: e364-e376.

PAKSHIR, K.; ZOMORODIAN, K., KARAMITALAB, M., JAFARI, M., TARAZ, H., EBRAHIMI, H. 2013. Phospholipase, esterase and hemolytic activities of *Candida* spp. isolated from onychomycosis and oral lichen planus lesions. **Journal de Mycologie Medicale**, **23 (2)**: 113–118.

PANNU, J.; MCCARTHY, A.; MARTIN, A.; HAMOUDA, T.; CIOTTI, S.; FOTHERGILL, A.; SUTCLIFFE, J. 2009. NB-002, a novel nanoemulsion with broad antifungal activity against dermatophytes, other filamentous fungi, and *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **53 (8)**: 3273-3279.

PAPEO, G.; PULICI, M. 2013. Italian chemists' contributions to named reactions in organic synthesis: an historical perspective. **Molecules**, **18**: 10870-10890.

PARK, M. J.; GWAK, K. S.; YANG, I.; KIM, K. W.; JEUNG, E. B.; CHANG, J. W.; CHOI, I. G. 2009. Effect of citral, eugenol, nerolidol and  $\alpha$ -terpineol on the ultrastructural changes of *Trichophyton mentagrophytes*. **Fitoterapia**, **80**: 290-296.

PATANKAR, M.; BHARGAVA, A.; AHLUWALIA, A. 2014. Comparison of the minimum fungicidal concentration of clotrimazole, ketoconazole, miconazole and terbinafine against clinical isolates of dermatophytes. **Indian Medical Gazette**, **2**: 65-68.

PEI, R-S.; ZHOU, F.; JI, B-P.; XU, J. 2009. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. **Journal of Food Science**, **74 (7)**: M379-M383.

PEREIRA, A. M. 2009. **Condicionantes institucionais para bioprospecção no Brasil**. Dissertação, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 290 p.

PEREIRA, C. A.; COSTA, A. C. B. P.; MACHADO, A. K. S.; BELTRAME JÚNIOR, M.; ZÖLLNER, M. S. A. C.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. C. 2011. Enzymatic activity, sensitivity to antifungal drugs and *Baccharis dracunculifolia* essential oil by *Candida* strains isolated from the oral cavities of breastfeeding infants and in their mothers' mounths and nipples. **Mycopathologia**, **171**: 103-109.

PEREIRA, F. O. **Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor sobre dermatófitos do gênero *Trichophyton***. 2009. Dissertação, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 119 p.

PEREIRA, F. O.; MENDES, J. M.; LIMA, E. O. 2013. Investigation on mechanism of antifungal activity of eugenol against *Trichophyton rubrum*. **Medical Micology**, **51**: 507-513.

PEREIRA, F. O.; WANDERLEY, P. A.; VIANA, F. A. C.; LIMA, R. B.; SOUZA, F. B.; LIMA, E. O. 2011. Growth inhibition and morphological alterations of *Trichophyton rubrum* induced by essential oil from *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor. **Brazilian Journal of Microbiology**, **42 (1)**: 233-242.

PEREIRA, M. J. Z. 2007. **Resistência do feijoeiro a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli***. Tese, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 103 p.

PERES, N. T. A.; SANCHES, P. R.; FALCÃO, J. P.; SILVEIRA, H. CS.; PAIÃO, F. G.; MARANHÃO, F. CA.; GRAS, D. R.; SEGATO, F.; CAZZANIGA, R. A.; MAZUCATO, M.; CURSINO-SANTOS, J. R.; AQUINO-FERREIRA, R.; ROSSI, A.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. 2010. Transcriptional profiling reveals the expression of novel genes in response to various stimuli in the human dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Bio Med Central Microbiology**, **10 (39)**: 1-10.

PERES, N. T. A.; ROSSI, A.; MARANHÃO, F. C. A.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. 2010. Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, **85 (5)**: 657-667.

PETERS, B. M.; YANO, J.; NOVERR, M. C.; FIDEL Jr, P. R. 2014. *Candida* vaginitis: when opportunism knocks, the host responds. **Plos Pathogens**, **10 (4)**: 1-4.

PINTO, A. C.; GALEMBECK, F.; ANDRADE, J. B. 2010. A química brasileira e a 4ª Conferência Nacional de Ciência Tecnologia e Inovação. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. **21 (2)**: 191.

PINTO, E.; VALE-SILVA, L.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. 2009. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Journal of Medical Microbiology**, **58**: 1454-1462.

PINTO, Z. V. 2008. **Desenvolvimento de substrato supressivo à murcha do crisântemo causada por *Fusarium oxysporum***. Tese, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 123 p.

PIO, T. F.; FRAGA, L. P.; MACEDO, G. A. Inoculum padronization for the production of cutinase by *Fusarium oxysporum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, **39 (1)**:74-77.

POLETTI, I.; MUNIZ, M. F. B.; CECONI, D. E.; SANTIN, D.; WEBER, M. N. D.; BLUME, E. 2006. Zoneamento e identificação de *Fusarium* spp. causadores de podridão de raízes em plantios de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Aa. St.-Hill.) na região do Vale do Taquarí, RS. **Ciência Florestal**, **16 (1)**: 1-10.

- PONNUSAMY, K.; PETCHIAMMAL, C.; MOHANKUMARD, R.; HOPPERC, W.; HOPPERC, W. 2010. In vitro antifungal activity of indirubin isolated from a south indian ethnomedicinal plant *Wrightia tinctoria* R. Br. **Journal of Ethnopharmacology**, **132**: 349–354.
- QUEIROZ, A. C. S.; ALBUQUERQUE, L. G.; MALINK, A. M. 2013. Gestão estratégica de pessoas e inovação: estudos de caso no contexto hospitalar. **Revista de Administração (São Paulo)**, **48 (4)**: 658-670.
- RAMOS, L. D. S.; BARBEDO, L. S.; BRAGA-SILVA, L. A.; DOS SANTOS, A. L.; PINTO, M. R.; SGARBI, D. B. 2015. Protease and phospholipase activities of *Candida* spp isolated from cutaneous candidiasis. **Revista Iberoamericana de Micología**, **32 (2)**: 122–125.
- RAVANELI, M. A. C. 2009. **Estudo da ecotoxicidade aguda em *Brachydanio rerio* de um herbicida comercial e seus principais componentes diuron e hexazinona**. Dissertação, Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 95 p.
- RAZAFIMAMONJISON, G.; JAHIEL, M.; DUCLOS, T.; RAMANOELINA, P.; FAWBUSH, F.; DANTH, P. 2014. Bud, leaf and stem essential oil composition of *Syzygium aromaticum* from Madagascar, Indonesia and Zanzibar. **Internation Journal of Basic and Applied Sciences**, **3 (3)**: 224-233.
- REZENDE, C.; BORSARI, G. P.; SILVA, A. C. F.; CAVALCANTI, F. R. 2008. Estudo epidemiológico das dermatofitoses em instituições públicas da cidade de Barretos, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, **40 (1)**: 13-16.
- RODRIGUES, E. R. 2007. **Estudo da ação de extratos vegetais de *Pothomorphe umbellata* e drogas antifúngicas sobre linhagens de *Trichophyton rubrum* e análise da expressão protéica**. Dissertação, Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 104 p.
- RODRIGUES, E. G.; LÍRIO, V. S.; LACAZ, C. S. 1992. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **34 (2)**: 159-165.
- ROSA, A. T. 2008. **Caracterização por microscopia eletrônica de transmissão e microanálise com raios X de filmes dielétricos crescidos termicamente sobre carbeto de silício**. Monografia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 37 p.
- SAHU, P. K.; SAHY, P. K.; THAVASELVAM, D.; ALAFEETY, A. M.; AGARWAL, D. D. 2015. Synthesis and evaluation of antimicrobial activity of 2-aminobenzothiazolomethyl naphthol derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, **24**: 725-736.
- SALAS-CAMPOS, I.; GROSS-MARTÍNEZ, N.; CARRILLO-DOVER, P. 2007. Micosis superficiales diagnosticadas in el laboratorio de micología médica de la Universidad de Costa Rica. **Revista Costarricense de Ciencias Médicas**, **28 (1/2)**: 29-35.

SALAS-CAMPOS, I.; GROSS-MARTÍNEZ, N.; CARRILLO-DOVER, P. 2009. Onicomycosis por hongos fuliginosos. **Acta Médica Costarricense**, **52 (4)**: 241-244.

SÃO PAULO. 2009. Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Instituto Biológico. Disponível em <[http://www.biologico.sp.gov.br/artigos\\_ok.php?id\\_artigo=95](http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=95)> Acesso em 19 junho 2016.

SPADER, T. B.; VENTURINI, T. P.; ROSSATO, L.; DENARDI, L. B.; CAVALHEIRO, P. B.; BOTTON, S. A.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. 2013. Synergism of voriconazole or itraconazole with other antifungal agents against species of *Fusarium*. **Revista Iberoamericana de Micología**, **30 (3)**: 200-204.

SANLA-EAD, N.; JANGCHUD, A.; CHONHENCHOB, V.; SUPPAKUL, P. 2011. Antimicrobial activity of cinnamaldehyde and eugenol and their activity after incorporation into cellulose- based packaging films. **Packaging Technology and Science**, **25**: 7–17.

SANTIN, J. R.; LEMOS, M.; KLEIN-JÚNIOR, L. C.; MACHADO, I. D.; COSTA, P.; OLIVEIRA, A. P.; TILIA, C.; SOUZA, J. P.; SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; ANDRADE, S. F. 2011. Gastroprotective activity of essential oil of the *Syzygium aromaticum* and its major component eugenol in different animal models. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, **383**: 149–158.

SANTOS, W. C.; da SILVA, F. C.; PINTO, A. C.; FERREIRA, V. F. 2015. Os novos fármacos aprovados em 2014 pelo *Food Drug Administration*: análise do relatório de 2015. **Revista Virtual de Química**, **7 (4)**: 1535-1551.

SCHECHTMAN, R. C. 2011. **Onicomycose**. In: BARAN, R.; NAKAMURA, R. Doenças da unha: do diagnóstico ao tratamento. 1 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 272 p.

SCHER, R. K.; TAVAKKOL, A.; BACT, D.; SIGURGEIRSSON, B.; HAY, R. J.; JOSEPH, W. S.; TOSTI, A.; FLECKMAN, P.; GHANNOUM, M.; ARMSTRONG, D. G.; MARKINSON, B. C.; ELEWSKI, B. E. 2007. Onychomycosis: diagnosis and definition of cure. **Journal of American Academy of Dermatology**, **56 (6)**: 939-944.

SCHER, R. K.; NAKAMURA, N.; TAVAKKOL, A. 2014. Luliconazole: a review of a new antifungal agent for the topical treatment of onychomycosis. **Mycoses**, **57**: 389–393.

SHAN, B.; CAI, Y.; BROOKS, J. D.; CORKE, H. 2007. Antibacterial properties and major bioactive components of cinnamon stick (*Cinnamomum burmannii*): activity against foodborne pathogenic bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **55 (14)**: 5484-5490.

SHEMER, A.; SAKKA, N.; BARAN, R.; SCHER, R.; AMICHAÏ, B.; NORMAN, L.; FARHI, R.; MAGUN, R.; BRAZILAI, A.; DANIEL, R. 2015. Clinical comparison and complete cure rates of terbinafine efficacy in affected onychomycotic toenails. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, **29**: 521-526.

SHEN, S.; ZHANG, T.; YUAN, Y.; LIN, S.; XU, J.; YE, H. 2015. Effects of cinnamaldehyde on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* membrane. **Food Control**, **47**: 196-202.

SHIRURKAR, D. D.; WAHEGAOKAR, N. K. 2012. Antifungal activity of selected plant derived oils and some fungicides against seed borne fungi of maize. **European Journal of Experimental Biology**, **2 (5)**: 1693-1696.

SHREAZ, S.; BHATIA, R.; KHAN, N.; MAURYA, I. K.; AHMAD, S. I.; MURALIDHAR, S.; MANZOOR, N.; KHAN, L. A. 2012. Cinnamic aldehydes affect hydrolytic enzyme secretion and morphogenesis in oral *Candida* isolates. **Microbial Pathogenesis**, **52**: 251-258.

SHREAZ, S.; SHEIKH, R. A.; BHATIA, R.; NEELOFAR, K.; IMRAN, S.; HASHMI, A. A.; MANZOOR, N.; BASIR, S. F.; KHAN, L. A. 2011. Antifungal activity of *a*-methyl *trans* cinnamaldehyde, its ligand and metal complexes: promising growth and ergosterol inhibitors. **Biometals**, **24**: 923-933.

SHREAZ, S.; SHEIKH, R. A.; RIMPLE, B.; HASHMI, A. A.; NIKHAT, M.; KHAN, L. A. 2010. Anticandidal activity of cinnamaldehyde, its ligand and Ni(II) complex: effect of increase in ring and side chain. **Microbial Pathogenesis**, **49**: 75-82.

SHREAZ, S.; BHATIA, R.; KHAN, N.; MURALIDHAR, S.; MANZOOR, N.; KHAN, L. A. 2013. Influences of cinnamic aldehydes on H<sup>+</sup> extrusion activity and ultrastructure of *Candida*. **Journal of Medical Microbiology**, **62**: 232-240.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, J. F. G. 2004. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan S. A., 408 p.

SILVA, A. F. 2009. **Investigação de propriedades ópticas de óleos magnéticos isolantes**. Dissertação, Universidade Federal de Brasília, Brasília, 98 p.

SILVA, C. R.; MAGALHÃES, H. I. F.; MORAES, M. O.; NOBRE JÚNIOR, H. V. 2013. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **46 (2)**: 244-245.

SILVA, S. C. 2011. **Tratamento químico e biológico de efluentes da indústria têxtil como forma de redução do impacto ambiental aos recursos hídricos**. Estudo de caso: Mar Indústria Têxtil e Tinturaria Ltda. Monografia. Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 44 p.

SILVA, E. M. F.; NASCIMENTO, R. B. C.; BARRETO, F. S.; MORAES FILHO, M. O.; GRIZ, S. A. S.; SANTOS, A. F.; MOUSINHO, K. C. 2015. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, **36 (2)**: 277-283.

SILVA, J. L. M.; FARIA, D. P.; DOIMO, G. 2011. Uso de ondas de alta frequência no tratamento de onicomicose - comunicação preliminar de três casos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, **86 (3)**: 598-600.

SIU, W. J. J.; TATSUMI, Y.; SENDA, H.; PILLAI, R.; NAKAMURA, T.; SONE, D.; FOTHERGILL, A. 2013. Comparison of in vitro antifungal activities of efinaconazol and

currently available antifungal agents against a variety of pathogenic fungi associated with onychomycosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **57 (4)**: 1610-1616.

SOARES, L. A.; SARDI, J. C. O.; GULLO, F. P.; PITANGUI, N. S.; SCORZONI, L.; LEITE, F. S.; GIANNINI, M. J. S. N.; ALMEIDA, A. M. F. 2013. Anti dermatophytic therapy - prospects for the discovery of new drugs from natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, **44 (4)**: 1035-1041.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA [200-]. **Manual de conduta nas onicomicoses**: Diagnóstico e tratamento. Disponível em: <<http://www.cuce.com.br/arq/onicomicoses.pdf>> Acesso em 31 jan. 2011.

SONI, A.; DAHIYA, P. 2014. Phytochemical analysis, antioxidant and antimicrobial activity of *Syzygium caryophyllatum* essential oil. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, **7 (supl. 2)**: 202-205.

SOUZA, A. E. F. 2007. **Atividade antimicrobiana de extratos de alho e Capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium moniliforme* isolado de grãos de milho**. Dissertação, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 103 p.

SOUZA, L. K. H.; OLIVEIRA, C. M. A.; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C.; OLIVEIRA JÚNIOR, J. G.; MIRANDA, A. T. B.; LIÃO, L. M.; SILVA, M. R. R. 2002. Antifungal properties of Brazilian cerrado plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, **33 (3)**: 247-249.

SOUZA, L. T. 2009. **Reação de genótipos de tomateiro às raças 2 e 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici***. Dissertação, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 48 p.

SPADER, T. B.; VENTURINI, T. P.; ROSSATO, L.; DENARDI, L. B.; CAVALHEIRO, P. B.; BOTTON, S. A.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. 2013. Synergism of voriconazole or itraconazole with other antifungal agents against species of *Fusarium*. **Revista Iberoamericana de Micología**, **30 (3)**: 200-204.

SPEZIALE, M. G. 2012. **Novos sistemas de acoplamentos cruzados em fase homogênea e heterogênea para a síntese de produtos de química fina**. Tese, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 166 p.

SÜLOGLU, A. K.; KARACAOGLU, E.; KOÇKAYA, E. A.; SELMANOGLU, G.; LOGOGLU, E. 2014. Cytotoxic effects of a novel thialo benzeno derivative 2,4-dithiophenoxy-1-iodo-4-bromobenzene (C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>S<sub>2</sub>I<sub>1</sub>Br) in L929 cells. **International Journal of Toxicology**, **33 (4)**: 319-324.

SUN, Z-N.; WANG, H-L.; LIU, F-Q.; CHEN, Y.; HANG, P. K.; YANG, D. 2009. Bodipy-based fluorescent probe for peroxynitrite detection and imaging in living cells. **Organic Letters**, **11 (9)**: 1887-1890.

TAGUSHI, Y.; HASUMI, Y.; ABE S.; NISHIYAMA, Y. 2013. The effect of cinnamaldehyde on the growth and the morphology of *Candida albicans*. **Medical Molecular Morphology**, **46**: 8-13.

TAKAKI, E. Y.; MODESTO JR., M. S.; FIGUEIREDO, L. H. M. 2007. Proteção intelectual e análise de mercado da biodiversidade brasileira. **Revista de Ciências Agrárias**, **48**: 143-159.

TATSUMI, Y.; NAGASHIMA, M.; SHIBANUSHI, T.; IWATA, A.; KANGAWA, Y.; INUI, F.; SIU, W. J. J.; PILLAI, R.; NISHIYAMA, Y. 2013. Mechanism of action of efinaconazole, a novel triazole antifungal agent. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **57 (5)**: 2405-2409.

TEIXEIRA, A. F. 2007. **Metabólitos secundários de frutos da *Virola molissima* (Poepp. ex A. DC.) Warb.**: neolignananas e atividade antifúngica. Tese, Universidade de São Paulo, São Paulo, 158 p.

TEJESWINI, M. G.; SOWNYA, H. V.; SWARNALATHA, S. P.; NEGI, P. S. 2014. Antifungal activity of essential oils and their combinations in vitro and in vivo conditions. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, **47 (5)**: 564-570.

TILLOTSON, J.; TILLOTSON, G. S. 2015. The regulatory pathway for antifungal drugs: a US perspective. **Clinical Infectious Diseases**, **61 (S6)**: 678-683.

TIMM, L. L. 2005. Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas. **Caderno La Salle XI**, **2 (1)**: 231-239.

TORRES, O. A. D. 2009. **A bioprospecção na Colômbia: um exemplo de conflito entre as capacidades de ciência e tecnologia e o marco regulatório**. Tese, Universidade de Campinas, Campinas, 146 p.

URIBE, C. C.; OLIVEIRA, F. S.; GROSSMANN, B.; KRETZMANN, N. A.; SILVEIRA, T. R.; GIUGLIANI, R.; MATTE, U. 2013. **Toxicology in Vitro**, **27**: 2105-2109.

URIBE, M. P.; CARDONA-CASTRO, N. 2013. Mecanismos de adherencia e adesi3n de dermatofitos a la piel. **Revista CES Medicina**, **27 (1)**: 67-75.

USTA, J.; DREYDIYYEH, S.; BAJAKIAN, K.; NAKKASH-CHMAISSE, H. 2002. *In vitro* effect of eugenol and cinnamaldehyde on membrane potential and respiratory chain complexes in isolated rat liver mitochondria. **Food and Chemical Toxicology**, **40**: 935-940.

VAN ZYLA, R. L., SEATHOLO, S. T., VAN VUUREN, S. F.; VILJOEN, A. 2010. Pharmacological Interactions of essential oil constituents on the viability of micro-organisms. **Natural Product Communications**, **5 (9)**: 1381-1386.

VARALAKSHMI, B.; ANAND, A. V.; KARPAGAM, T.; BAI, J. S.; MANIKANDAN, R. 2014. In vitro antimicrobial and anticancer activity of *Cinnamomum zeylanicum* Linn bark extracts. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, **6 (supl. 1)**: 12-18.

VENTUROSOSO, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L.; PONTIM, B. C. A.; CONUS, L. A. 2010. Influência de diferentes metodologias de esterilização sobre a

atividade antifúngica de extratos aquosos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, **12 (4)**: 499-505.

WANG, G-S.; DENG, J-H.; MA, Y-H.; SHI, M.; LI, B. 2012. Mechanisms, clinically curative effects, and antifungal activities of cinnamon oil and pogostemon oil complex against three species of *Candida*. **Journal of Traditional Chinese Medicine**, **32 (1)**: 19-24.

WANG, R.; WANG, R.; YANG, B. Extraction of essential oils from five cinnamon leaves and identification of their volatile compound compositions. 2009. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, **10**: 289–292.

XIE, Y.; YANG, Z.; CAO, D.; RONG, F.; DING, H.; ZHANG, D. 2015. Antitermic and antifungal activities of eugenol and its congeners from the flower buds of *Syzigium aromaticum* (clove). **Industrial Crops and Products**, **77**: 780-786.

XING, F.; HUA, H.; SELVARAJ, J. N.; ZHAO, Y.; ZHOU, L.; LIU, X.; LIU, Y. 2014. Growth inhibition and morphological alterations of *Fusarium verticillioides* by cinnamon oil and cinnamaldehyde. **Food Control**, **46**: 343-350.

XING, Y.; XU, Q.; LI, X.; CHE, Z.; YUN, J. 2012. Antifungal activities of clove oil against *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium citrinum* *in vitro* and in wounded fruit test. **Journal of Food Safety**, **32**: 84-93.

YAMAMOTO, N. S.; PEREIRA, C. D. S.; CORTEZ, F. S.; PUSCEDDO, F. H.; SANTOS, A. R.; GUIMARÃES, L. L. 2012. Avaliação dos efeitos biológicos do fármaco Losartan em microcrustáceos *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia* (Crustacea, Cladocera). **Unisanta BioScience**, **1 (2)**: 49-53.

YE, H.; SHEN, S.; XU, J.; LIN, S.; YUAN, Y.; JONES, G. S. 2013. Synergistic interactions of cinnamaldehyde in combination with carvacrol against food-borne bacteria. **Food Control**, **34**: 619-623.

YEH, T-F.; LIN, C-Y.; CHANG, S-T. 2014. A potential low-coumarin cinnamon substitute: *Cinnamomum osmophloeum* leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **62**: 1706-1712.

YOON, M-Y.; CHA, B.; KIM, J-C. 2013. Recent trends in studies on botanical fungicides in agriculture. **The Plant Pathology Journal**, **29 (1)**: 1-9.

ZIMMERMAM-FRANCO, D. C.; BOLUTARI, E.; POLONINI, H. ; DO CARMO, A. ; CHAVES, G. A. M.; RAPOSO, N. R. B. 2013. Antifungal activity of *Copaifera langsdorffii* Desf oleoresin against dermatophytes. **Molecules (Basel. Online)**, **18**: 12561-12570.

ZIÓLKOWSKA, G.; NOWAKIEWICZ, A.; GNAT, S.; TROSCIANCZYK, A.; ZIEBA, P.; DZIEDZIC, M. 2015. Molecular identification and classification of *Trichophyton mentagrophytes* complex strains isolated from humans and selected animal species. **Mycoses**, **58**: 119-126.

ZUCKER, E. 1985. **Hazard Evaluation Division** - Standard Evaluation Procedure – Acute toxicity test for freshwater fish. USEPA Publication 540/9-85-006 *apud* Manrique, W. G. 2009. Toxicidade aguda, risco ambiental do fipronil para o guarú (*Poecilia reticulata*) e dissipação no ambiente aquático. Dissertação, Universidade Estadual Paulista, 56 p.

ZUZARTE, M.; GONÇALVES, M. J.; CAVALEIRO, C.; CRUZ, M. T.; BENZARTI, A.; MARONGIU, B.; MAXIA, A.; PIRAS, A.; SALGUEIRO, L. 2013. Antifungal and anti-inflammatory potential of *Lavandula stoechas* and *Thymus herba-barona* essential oils. **Industrial Crops and Products**, **44**: 97-103.

## APÊNDICE

### APÊNDICE A - Produção científica

MARTINS, F. J.; LIMA, R. M.; SANTOS, J. A.; MACHADO, P. A.; COIMBRA, E. S.; SILVA, A. D.; RAPOSO, N. R. B. 2016. Biological properties of heterocyclic pyridinylimines and pyridinylhydrazones. **Letters in Drug Design & Discovery**, **13**: 107-114.

MARTINS, F. J.; CANESCHI, C. A.; VIEIRA, J. L. F.; BARBOSA, W.; RAPOSO, N. R. B. 2016. Antioxidant activity and potential photoprotective from amazon native flora extracts. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, **161**: 34-39.

CANESCHI, C. A.; MARTINS, F. J.; LARRUDÉ, D. G.; ROMANI, E. C.; BRANDÃO, M. A. F.; RAPOSO, N. R. B. 2015. *In vitro* antifungal activity of *Baccharis trimera* Less (DC) essential oil against dermatophytes. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research (Print)**, **14**: 2083-2089.

RODRIGUES, J. B.; MARTINS, F. J.; RAPOSO, N. R. B.; CHICOUREL, E. L. 2014. Perfil de utilização de medicamentos por sonda enteral em pacientes de um hospital universitário. **Revista Brasileira de Farmácia Hospitalar e Serviços de Saúde**, **5**: 23-27.

MARTINS, F. J.; RAPOSO, N. R. B.; CHICOUREL, E. L. 2013. Nutrição em paciente cirrótico. **HU Revista**, **39**: 45-54.