

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE

**César Augusto Caneschi**

AÇÃO ANTIFÚNGICA DE DERIVADOS AMINO ÁLCOOIS E  
DIAMINAS FRENTE AOS PRINCIPAIS CAUSADORES DE  
ONICOMICOSSES

Juiz de Fora

2018

**CÉSAR AUGUSTO CANESCHI**

**AÇÃO ANTIFÚNGICA DE DERIVADOS AMINO ÁLCOOIS E  
DIAMINAS FRENTE AOS PRINCIPAIS CAUSADORES DE  
ONICOMICOSSES**

Defesa de Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Saúde, para obtenção do Título de Doutor em Saúde. Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora.

**Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Nádia Rezende Barbosa Raposo**

**Co-orientador: Prof. Dr. Mauro Vieira de Almeida**

Juiz de Fora

2018

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Caneschi, César Augusto.

Ação antifúngica de derivados amino álcoois e diaminas frente aos principais causadores de onicomicoses / César Augusto Caneschi. -- 2018.

133 f. : il.

Orientadora: Nádya Rezende Barbosa Raposo

Coorientador: Mauro Vieira de Almeida

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2018.

1. Fungo. 2. Onicomicoses. 3. Amino álcoois. 4. Diaminas. 5. Microscopia eletrônica de varredura. I. Raposo, Nádya Rezende Barbosa, orient. II. Almeida, Mauro Vieira de, coorient. III. Título.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

### AÇÃO ANTIFÚNGICA DE DERIVADOS AMINO ÁLCOOIS E DIAMINAS FRENTE AOS PRINCIPAIS CAUSADORES DE ONICOMICOSSES

CÉSAR AUGUSTO CANESCHI

Defesa de Tese de Doutorado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Saúde, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Título de Doutor em Saúde.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_:

Banca examinadora:

---

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

---

Co-orientador: Prof. Dr. Mauro Vieira de Almeida  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Angelina Maria de Almeida  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. Dr. Geraldo Sérgio Farinazzo Vitral  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. Dr. Eduardo Lima Nolasco  
Faculdade de Minas

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Francislene Juliana Martins  
Universidade Federal Fluminense

## DEDICATÓRIA

*“Dedico esta Tese ao meu pai Sebastião de Paulo Caneschi e à minha mãe Maria Luiza Caneschi”.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela força e coragem para nunca desistir dos desafios.

Agradeço aos meus pais por todo carinho, paciência, estímulo, educação e suporte para que eu pudesse chegar a mais esta etapa.

Agradeço ao meu pai Sebastião que me ensinou desde sempre a acreditar e buscar meus sonhos, meus objetivos, aonde quer que estejam, com verdade, persistência e ética. Agradecer à Maria Luiza, minha mãe, é lembrar de todo o amor possível, dedicação e carinho, que me proporciona para seguir em frente.

Agradeço a meu irmão Dr. Fernando que sempre foi fonte de inspiração na minha vida acadêmica.

Agradeço à minha orientadora, professora Dr<sup>a</sup> Nádia, por todo o conhecimento e oportunidades proporcionados.

Agradeço a minha namorada Renata por toda ajuda, companheirismo, apoio e compreensão.

Agradeço ao Professor Dr Mauro, que sempre esteve pronto para me ajudar em todos os momentos desta caminhada e pelas grandes contribuições que foram fundamentais para a realização desta pesquisa.

Agradeço à FUPAC – Ubá pela contribuição indireta para a realização deste trabalho.

Aos amigos que me auxiliam continuamente nos trabalhos, em especial à Fran e Renata, parceiras de bancada.

Aos amigos do NIQUA.

Agradeço à Dra. Angelina Maria de Almeida e ao Bruno Assis de Oliveira pelo apoio e colaboração, uma vez que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao Dr. Manoel Marques Evangelista Oliveira e ao Dr. Rodrigo Paes, pesquisadores da Fiocruz, pela parceria estabelecida para a realização de análises.

Agradeço ao Professor Frederico Pitella pelo apoio de sempre e pela colaboração nas análises.

Agradeço ao Professor Gilson por toda contribuição proporcionada.

À professora Sandra Neves por toda colaboração.

Ao Farmacêutico Ronaldo pela colaboração.

À amiga Nádia que sempre me apoiou e incentivou com palavras, sorrisos e um bom café.

À Professora Beth pelas conversas e por todo apoio e incentivo.

À CAPES pelo financiamento de minha bolsa de estudos.

Enfim, a todos que me ajudaram e torceram pelo sucesso deste trabalho e por este momento.

“Todos os nossos sonhos poderão se tornar realidade se houver a coragem de  
querer realizá-los”

Walt Disney

## RESUMO

As onicomicoses são infecções fúngicas que se caracterizam clinicamente por alterações morfológicas no tecido ungueal proporcionadas, principalmente, por fungos filamentosos dermatófitos, seu principal agente etiológico. Esta micose é considerada um problema de saúde pública e apresenta inúmeros fatores que podem favorecer o seu início. O tratamento é considerado um grande desafio para a medicina, uma vez é prolongado, apresenta reduzida eficácia e recidivas frequentes, além de ocasionar efeitos adversos aos pacientes. Diante do exposto, surge a necessidade de obtenção de novos compostos farmacologicamente ativos para esta finalidade. Desta forma, a síntese de compostos orgânicos e a investigação do potencial antifúngico pode impulsionar a elucidação de novos antifúngicos. Logo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de amino álcoois e diaminas frente aos principais fungos causadores de onicomicoses. Para isso, foi realizada a análise antifúngica a fim de estabelecer as concentrações inibitória mínima (CIM) e fungicida mínima (CFM) frente as cepas de referência de *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11481, *T. rubrum* CCT 5507 URM 1666, *Epidermophyton floccosum* CCF-IOF-3757, *Candida albicans* ATCC 10231 e um isolado clínico de *C. albicans*. Para auxiliar na compreensão da ação antifúngica foi empregada a microscopia eletrônica de varredura (MEV) juntamente com a avaliação de fatores de virulência fúngica (fosfolipase e melanina). Por último, foi investigada ainda a citotoxicidade *in vitro* dos amino álcoois frente a células de fibroblastos (L929) e queratinócitos (HaCaT). A partir de um grupo de cinquenta moléculas sintetizadas, foram selecionados três amino álcoois com cadeia alifática com 10, 12 e 14 carbonos (C) que foram fungicidas frente às cinco cepas de fungos avaliadas com valores de CIM variando de 0,46 – 1.000 µg/mL e CFM entre 7,81 - 1.000 µg/mL. Entre estas, destaque para o amino álcool com 14 C. Por meio das eletromicrografias foi possível evidenciar alterações morfológicas nas estruturas fúngicas das cinco espécies submetidas à ação dos amino álcoois selecionados, o que demonstrou sua ação sobre os fungos avaliados. Os compostos proporcionaram interferência na excreção de fosfolipase, no entanto, não interferiram na produção de melanina. Os amino álcoois revelaram relativa toxicidade frente às células L929 e HaCaT. Por meio dos resultados apresentados neste trabalho, é possível atribuir aos amino álcoois ação antifúngica frente aos principais fungos causadores da onicomicoses, entretanto, essas moléculas apresentaram toxicidade *in vitro* frente a fibroblastos e queratinócitos. Deste modo, os achados contribuem para a modificação estrutural das moléculas analisadas e/ ou síntese de novos compostos mais eficazes e menos tóxicos para o tratamento de onicomicoses.

Palavras-chave: Fungo. Onicomicoses. Amino álcoois. Microscopia eletrônica de varredura. Citotoxicidade.

## ABSTRACT

Onychomycosis is a fungal infection characterized clinically by morphological changes in the nail tissue provided mainly by dermatophyte filamentous fungi, the main etiological agent. This mycosis is considered a public health problem and presents numerous factors that may favor its beginning. Its treatment is considered a great challenge for medicine, once it is prolonged, it presents reduced efficacy and frequent recurrences, besides causing adverse effects to the patients. In view of the above, there is a need to obtain new pharmacologically active compounds for this purpose. In this context, the synthesis of organic compounds and the investigation of the antifungal potential may boost the elucidation of new antifungal agents. Therefore, the objective of this work was to evaluate the antifungal activity in vitro of diamines and amino alcohols against the main fungi causing onychomycosis. For this, antifungal analysis was carried out to establish the minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum fungicide (CFM) against *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11481, *T. rubrum* CCT 5507 URM 1666, *Epidermophyton floccosum* CCF-IOF-3757, *Candida albicans* ATCC 10231 and a clinical isolate of *C. albicans*. A scanning electron microscopy (SEM) along with the evaluation of fungal virulence factors (phospholipase and melanin). Finally, the in vitro cytotoxicity of amino alcohols against fibroblast cells (L929) and keratinocytes (HaCaT) was further investigated. From a group of fifty synthesized molecules, three amino alcohols with 10, 12 and 14 C aliphatic chain were selected which were fungicidal against the five fungal strains evaluated with MIC values ranging from 0.46-1,000 µg/ mL and CFM between 7.81-1,000 µg/ mL. Among them, the amino alcohol with 14 C was featured. Using the electromicrographs, it was possible to show morphological changes in the fungal structures of the five species submitted to the action of the selected amino alcohols, which demonstrates their action on the evaluated fungi. The compounds provided interference in phospholipase excretion, however, did not interfere with melanin production. Amino alcohols revealed relative toxicity to L929 and HaCaT cells. Thus, the findings contribute to the structural modification of the molecules analyzed and / or synthesis of new compounds more effective and less toxic for the treatment of mycosis.

Keywords: Fungi. Onychomycosis. Amino alcohol. Scanning electron microscopy of. Cytotoxicity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Anatomia da unha.	22
Figura 2: Eletromicrografias do tecido ungueal humano.	23
Figura 3: Representação clínica das onicomicoses.	26
Figura 4: Colônias de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> .	29
Figura 5: Aspectos micromorfológicos de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> .	29
Figura 6: Colônia de <i>Trichophyton rubrum</i> .	29
Figura 7: Aspectos micromorfológicos de <i>Trichophyton rubrum</i> .	30
Figura 8: Colônias de <i>Epidermophyton floccosum</i> .	31
Figura 9: Aspectos micromorfológicos de <i>Epidermophyton floccosum</i> .	31
Figura 10: Aspectos microscópicos de <i>Candida albicans</i> .	32
Figura 11: Aspectos macroscópicos de: (A): <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 e (B) isolado clínico de <i>Candida albicans</i> .	32
Figura 12: Modelo de biofilme desenvolvido por leveduras e fungos filamentosos.	35
Figura 13: Estrutura química dos principais representantes dos azóis.	39
Figura 14: Mecanismos de ação das principais classes de antifúngicos.	39
Figura 15: Estrutura química do cloridrato de terbinafina.	40
Figura 16: Fórmula estrutural da amorolfina.	41
Figura 17: Fórmula estrutural da anfotericina B (1) e da nistatina (2).	42
Figura 18: Fórmula estrutural do ciclopirox.	43
Figura 19: Fórmula estrutural do tavaborole.	44
Figura 20: Fórmula estrutural do etambutol.	47
Figura 21: Fluxograma representativo do presente estudo.	49
Figura 22: Morfologia macroscópica de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 11481.	53
Figura 23: Morfologia macroscópica de <i>Trichophyton rubrum</i> CCT 5507 URM 1666.	54
Figura 24: Morfologia macroscópica de <i>Epidermophyton floccosum</i> CCF-IOF-3757.	54
Figura 25: Morfologia macroscópica de <i>Candida albicans</i> .	55
Figura 26: Esquema do microcultivo em lâmina de vidro.	56
Figura 27: Imagem de microcultura de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 11481.	57

Figura 28: Imagem de microcultura de <i>Trichophyton rubrum</i> CCT 5507 URM 1666.	57
Figura 29: Imagens do microcultura de <i>Epidermophyton floccosum</i> CCF-IOC-3757.	58
Figura 30: Esquema para avaliação de levedura por microscopia óptica.	58
Figura 31: Imagens do microcultura de <i>Candida albicans</i> .	59
Figura 32: Esquema para avaliação da produção de fosfolipase.	69
Figura 33: Micrografias eletrônicas de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 11481.	85
Figura 34: Micrografias eletrônicas de <i>Trichophyton rubrum</i> CCT 5507 URM 1666.	87
Figura 35: Micrografias eletrônicas de <i>Epidermophyton floccosum</i> CCF-IOC-3757.	89
Figura 36: Micrografias eletrônicas de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.	90
Figura 37: Atividade da fosfolipase de fungos dermatófitos e leveduras sem tratamento com antifúngico.	92
Figura 38: Avaliação de citotoxicidade das moléculas “1”, “2” e “3” frente a fibroblastos (L929) e queratinócitos (HaCaT).	97
Figura 39: Avaliação de citotoxicidade dos fármacos de referência frente a fibroblastos murinos (L929).	100
Figura 40: Avaliação de citotoxicidade dos fármacos de referência frente aos queratinócitos (HaCaT).	101

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Identificação das moléculas submetidas à atividade antifúngica.	50
Tabela 2: Forma de solubilização das amostras avaliadas.	63
Tabela 3: Perfil de classificação dos resultados da atividade enzimática	69
Tabela 4: Concentração inibitória mínima das moléculas frente aos principais fungos causadores de onicomicoses.	74
Tabela 5: Estruturas químicas das moléculas selecionadas	77
Tabela 6: Suscetibilidade <i>in vitro</i> dos principais fungos causadores de onicomicoses frente às moléculas orgânicas e aos fármacos de referência.	78
Tabela 7: Valores de Pz para a atividade da enzima fosfolipase	92
Tabela 8: Produção de melanina por diferentes espécies fúngicas	94

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abs	Absorvância
APS	Ácido periódico de Schiff
ATCC	Coleção de cultura tipo americana (do inglês <i>American Type Culture Collection</i> )
BLAST	Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local (do inglês <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> )
C	Carbono
CCF IOC	Coleção de Culturas de Fungos do Instituto Oswaldo Cruz
CCT	Coleção de Culturas Tropicais
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais (do inglês <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> )
cm	Centímetro
cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado
DMEM	<i>Meio Eagle</i> modificado por Dulbecco (do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> )
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>desoxyribonucleic acid</i> )
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Administração de Alimentos e Drogas (do inglês <i>Food and Drugs Administration</i> )
Fe <sup>3+</sup>	Íon férrico trivalente
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
Eq	Equação
FUPAC	Fundação Presidente Antônio Carlos
g	Gramma
G	Força gravitacional
h	Hora
H	Hidrogênio
HaCaT	Queratinócito humano

HEPES	Ácido <i>N</i> -2-hidroxietilpiperazina- <i>N</i> -2-etanossulfônico
ID	Identificação genérica
ITS	Espaçador transcrito interno (do inglês <i>Internal Transcribed Spacer</i> )
kv	Quilovolt
L	Litro
L929	Fibroblasto murino
M	Molaridade
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
MOPS	Ácido 3( <i>N</i> -morfolino) propanossulfônico
MTT	Brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio
N	Nitrogênio
NA	Não avaliado
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica (do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i> )
ng	Nanograma
NIQUA	Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica
nm	Nanômetro
NUPICS	Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde
O	Oxigênio
PA	Pró-análise
PBS	Tampão fosfato de sódio (do inglês <i>phosphate sodium buffer</i> )
PCR	Reação em cadeia de polimerase (do inglês <i>polymerase chain reaction</i> )
PDA	Ágar batata dextrose (do inglês <i>potato dextrose agar</i> )
pH	Potencial hidrogeniônico
PLB1	Gene PLB1
pmol	picomol
Pz	Razão empregada para cálculo da atividade fosfolipase

p/v	Peso/volume
qsp	Quantidade suficiente para
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossômico (do inglês <i>ribosomal deoxyribonucleic acid</i> )
RJ	Rio de Janeiro
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro (do inglês <i>Messenger ribonucleic acid</i> )
RNA <sub>t</sub>	Ácido ribonucleico transportador (do inglês <i>ribonucleic acid transporter</i> )
ROS	Espécie reativa de oxigênio (do inglês <i>reactive oxygen species</i> )
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDB	Caldo <i>Sabouraud</i> dextrose (do inglês <i>sabouraud dextrose broth</i> )
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
sp	Espécie
spp.	Espécies
T	Transmitância
TrisHCl	Ácido Tris hidrocloreídrico
<i>TruMDR</i>	Transportador celular
UFC	Unidade formadora de colônia
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UI	Unidade Internacional
VIH	Vírus da imunodeficiência humana
µg	Micrograma
v/v	Volume/volume
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
%	Porcentagem
° C	Graus Célsius
>	Maior
<	Menor

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>OBETIVOS</b>	<b>21</b>
2.1	Geral	21
2.2	Específicos	21
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>22</b>
<b>3.1</b>	<b>Anatomia da unha</b>	<b>22</b>
<b>3.2</b>	<b>Onicomicoses</b>	<b>23</b>
3.2.1	Agente etiológico	27
3.2.1.1	Fungo filamentosso dermatófito	27
3.2.1.2	Fungos leveduriformes	31
3.2.2	Fatores de virulência	32
<b>3.3</b>	<b>Diagnóstico das onicomicoses</b>	<b>35</b>
3.3.1	Diagnóstico clínico	35
3.3.2	Diagnóstico laboratorial	36
3.3.2.1	Microscopia óptica direta	36
3.3.2.2	Diagnóstico por cultura microbiológica	37
3.3.2.3	Diagnóstico pelo ácido periódico de <i>Schiff</i>	37
<b>3.4</b>	<b>Tratamento das onicomicoses</b>	<b>37</b>
3.4.1	Derivados azólicos	38
3.4.2	Alilaminas	40
3.4.3	Morfolinos	41
3.4.4	Polienos	41
3.4.5	Hidroxipiridona	42
3.4.6	Terapias complementares	43
<b>3.5</b>	<b>Resistência microbiana aos agentes antifúngicos</b>	<b>44</b>
<b>3.6</b>	<b>Compostos amino álcoois e diaminas</b>	<b>46</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>49</b>
<b>4.1</b>	<b>Moléculas orgânicas</b>	<b>49</b>
<b>4.2</b>	<b>Cepas fúngicas</b>	<b>53</b>

<b>4.3 Realização do microcultivo</b>	<b>55</b>
4.3.1 Fungo filamentosos .....	55
4.3.2 Fungo leveduriforme .....	58
<b>4.4 Caracterização molecular</b>	<b>59</b>
<b>4.5 Atividade antifúngica</b>	<b>60</b>
4.5.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) .....	60
4.5.1.1 Padronização do inóculo .....	61
4.5.1.2 Diluição dos agentes antifúngicos .....	62
4.5.1.3 Preparo da microplaca .....	63
4.5.2 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM) .....	64
4.5.2.1 Fase filamentosos .....	64
4.5.2.2 Fase leveduriforme .....	64
<b>4.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</b>	<b>65</b>
4.6.1 Fase filamentosos .....	65
4.6.2 Fungo leveduriforme .....	65
4.6.3 Diluição dos agentes antifúngicos .....	65
4.6.4 Preparo da microplaca .....	66
4.6.5 Preparo para fungos filamentosos .....	66
4.6.6 Preparo para leveduras .....	67
<b>4.7 Fatores de virulência</b>	<b>68</b>
4.7.1 Determinação da atividade de fosfolipase .....	68
4.7.2 Determinação da produção de melanina .....	69
<b>4.8 Avaliação da citotoxicidade</b>	<b>70</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>72</b>
<b>5.1 Atividade antifúngica</b>	<b>72</b>
<b>5.2 Microscopia eletrônica de varredura</b>	<b>84</b>
<b>5.3 Atividade enzimática</b>	<b>91</b>
<b>5.4 Avaliação da citotoxicidade</b>	<b>95</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b>	<b>104</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>105</b>



## 1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas possuem elevada prevalência em nível mundial e, principalmente, em países tropicais como o Brasil (KHOSRAVI et al., 2013; PELEGRINI et al., 2009). Entre os diversos tipos de micoses que afetam o ser humano, merece destaque as onicomicoses, infecções que acometem as unhas e, em maior frequência, a região ungueal dos pés (IORIZZO, 2015; MADDY; TOSTI, 2017; MURDAN, 2016; VEJNOVIC; SIMMLER; BETZ, 2010; WELSH; VERA-CABRERA; WELSH, 2010).

As onicomicoses acometem de 2 a 13 % da população mundial e representam 50 % das doenças ungueais (EMAM; EL-SALAM, 2016; HAJAR et al., 2016; KIKI-BARRO et al., 2017; LAFFLEUR; ATAIL, 2017; MARTÍNEZ et al., 2014; SOLTANI et al., 2015). Esta infecção fúngica apresenta grande relevância, pois não só pode afetar a qualidade de vida das pessoas, mas também propiciar a perda da capacidade funcional do membro acometido, com conseqüente prejuízo no desempenho profissional (EMAM; EL-SALAM, 2016; LAFFLEUR; ATAIL, 2017). Além disso, por questões estéticas, o cuidado com as unhas e a sua aparência têm significativo impacto no bem estar do indivíduo, o que ocasiona redução da autoestima e prejudica sua inserção social (AMRI et al., 2010; ARAÚJO; CAMPOS, 2013).

Seus principais agentes etiológicos são os fungos filamentosos dermatófitos (80 a 90 %), leveduras (3 a 5 %) e fungos filamentosos não-dermatófitos (3 a 5 %) (GATICA et al., 2017; IMBERT et al., 2016; ROY; BHATT, 2015), entre o quais podemos citar as cepas de: *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum* e *Candida albicans* (EMAM; EL-SALAM, 2016; MOUBASHER; ABDEL-SATER; SOLIMAN, 2017; SLEVEN et al., 2015; WELSH; VERA-CABRERA; WELSH, 2010).

Mesmo diante dos avanços na medicina, o tratamento das onicomicoses ainda é considerado um desafio, em virtude das características anatômicas da unha e dos medicamentos disponíveis (IORIZZO, 2015; KHOSRAVI et al., 2013; PASKIABI et al., 2017; ROMERO-CERECERO et al., 2009). Outro ponto relevante é a elevada espessura do tecido ungueal, este é considerado um grande entrave ao tratamento eficaz das onicomicoses, uma vez que dificulta a permeação dos compostos antifúngicos de uso tópico através da placa ungueal

até alcançar o fungo (ROBRES et al., 2015). Segundo Sai Devi e colaboradores (2012) e Robres e colaboradores (2015), os medicamentos antifúngicos apresentam reduzida efetividade (40 – 70 %), bem como o uso inadequado dos mesmos culmina na ocorrência de recidivas e no desenvolvimento de possível resistência fúngica. É importante ressaltar ainda a hepatotoxicidade ocasionada por esses fármacos (PASKIABI et al., 2017; PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017; SOLTANI et al., 2015).

Tendo em vista a problemática apresentada, há busca contínua por novos compostos antifúngicos com maior eficácia que os já disponíveis no mercado, mas, sobretudo, com reduzidos efeitos adversos ao paciente. Dessa forma, pesquisadores têm se engajado em trabalhos de síntese de moléculas orgânicas com grupos funcionais diversos, dentre eles os amino álcoois e as diaminas, os quais vêm proporcionando alvissareiros resultados em atividades biológicas contra o gênero *Leishmania* e em espécies de *Trichomonas vaginalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, assim como as formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* e frente a fungos dermatófitos e leveduras (CANESCHI et al., 2017; SOUZA FERNANDES et al., 2016; SALES JR et al., 2014).

Diante dos resultados promissores dos compostos anfifílicos, amino-álcoois e diaminas, na ação contra os diversos grupos de micro-organismos apresentados, moléculas destas classes de substâncias foram selecionadas para a avaliação de sua atividade antifúngica *in vitro* frente às principais cepas responsáveis pelas onicomicoses, como possível alternativa para o tratamento destas infecções cutâneas.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de amino álcoois e diaminas frente aos principais fungos causadores de onicomicoses.

### **2.2 Específicos**

- Estabelecer a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) para os amino álcoois e diaminas.

- Avaliar a morfologia fúngica antes e após o tratamento com as substâncias de interesse por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV).

- Determinar a interferência das moléculas avaliadas sobre a produção da fosfolipase e de melanina dos fungos de interesse avaliados.

- Avaliar a citotoxicidade das moléculas empregadas frente a células de fibroblastos (L929) e queratinócito (HaCaT).

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Anatomia da unha

A unha está entre os principais anexos da pele e corresponde a uma estrutura que proporciona proteção às extremidades dos dedos. É composta basicamente por queratina, semelhante ao cabelo, não possui vascularização, com exceção do leito ungueal, e apresenta reduzido percentual de melanócitos, o que garante uma coloração mais clara em relação à pele que a circunda (VEJNOVIC; SIMMLER; BETZ, 2010; WESTERBERG; VOYACK, 2013). Apresenta crescimento mensal por volta de 3 mm para as unhas das mãos e cerca de 1 mm para as unhas dos pés; tamanho esse que pode variar com a idade, sexo e condições de saúde de cada indivíduo (IORIZZO, 2015; TUCKER, 2015).

O tecido ungueal é originário da epiderme por um processo de queratinização que proporciona a formação de uma lâmina com aspecto convexo, a qual se insere na extremidade dorsal dos dedos. A unha é composta pelas pregas ungueais (lateral, proximal, distal e superior), o leito ungueal, o hiponíquio e a matriz. Sua principal parte é a matriz (lúnula), responsável pelo seu desenvolvimento (Figura 1) (CASHMAN; SLOAN, 2010).

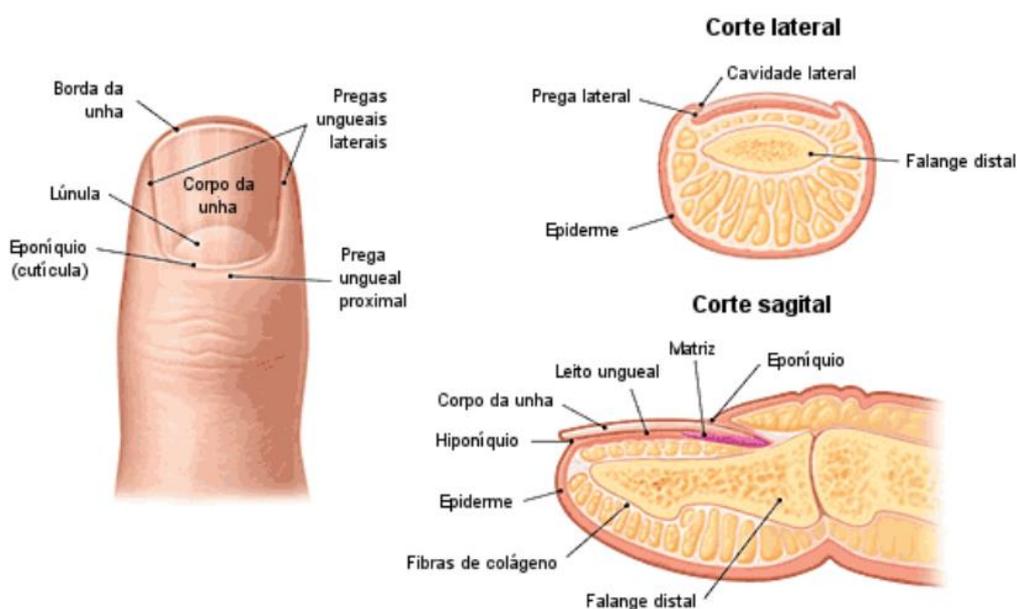


Figura 1: Anatomia da unha.  
Fonte: Adaptado de Sanches (2012).

Da matriz, a lâmina desliza sobre o leito ungueal e alcança gradualmente, com a borda livre, a parte final da falange distal de cada dedo, com a qual forma ângulo agudo, a ranhura subungueal. A prega ungueal superior (eponíquio ou cutícula) é a responsável pela produção de uma camada de estrato córneo com função protetora contra agentes infecciosos (ARAÚJO; CAMPOS, 2013; BARBOSA et al., 2013; SANCHES, 2012).

A placa ungueal humana é composta por 25 camadas de células mortas queratinizadas e achatadas (Figura 2) com consistência dura, embora apresente certa elasticidade (CASHMAN; SLOAN, 2010; ELSAYED, 2015; MURDAN, 2002).

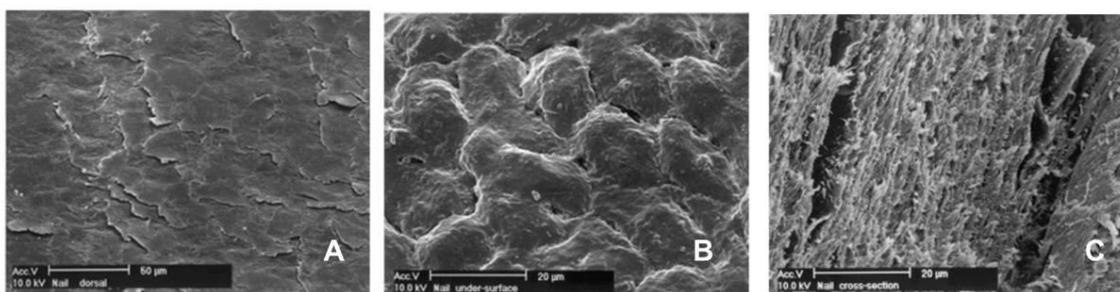


Figura 2: Eletromicrografias do tecido ungueal humano.

A: superfície dorsal; B: superfície inferior; C: seção de corte transversal.

Fonte: Adaptado de Murdan (2002).

As unhas rotineiramente sofrem traumas e, não raramente, são alvos de infecções fúngicas denominadas de onicomicose ou *tinea unguium* (HUBE et al., 2015; SAI DEVI et al., 2012). Esta é ocasionada principalmente por fungos filamentosos dermatófitos, os quais podem causar diversas alterações na lâmina ungueal, como aumento da sua espessura, extensão, forma, consistência, coloração e aderência (IORIZZO, 2015; MCCARTHY, 2004).

### 3.2 Onicomicoses

As onicomicoses são micoses superficiais cutâneas que acometem a região ungueal; essas correspondem à metade das patologias associada às unhas e a 30 % das dermatomicoses (EMAM; EL-SALAM, 2016; LUSIANA; MÜLLER-GOYMANN, 2013; MCAULEY et al., 2016; TUCKER, 2015). É importante salientar que essas não são consideradas como doenças de notificação compulsória (OLIVEIRA, 2014).

As onicomicoses afetam grande parcela da população mundial, com destaque para as regiões tropicais, idosos e pessoas que sofreram traumatismo na região ungueal ou portadores de doenças como diabetes (especificamente casos de pé diabético), síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) e câncer (ARAIZA-SANTIBÁNEZ et al., 2016; BIESBROECK; FLECKMAN, 2015; OYARZO; CHOAPPA, 2015; PERES et al., 2010a; BIESBROECK; FLECKMAN, 2015; CHERNOFF; SCHER, 2016; LUSIANA; MÜLLER-GOYMANN, 2013; WISSELINK; ZANTEN; KOOISTRA-SMID, 2011).

Em adultos, é observado um crescimento lento das unhas, fato que favorece a infecção fúngica e justifica a menor incidência em crianças, pois o tecido ungueal cresce de forma mais rápida, o que dificulta a adesão fúngica (CHU; RUBIN, 2014).

A maioria dos casos de onicomicoses ocorre nas unhas dos pés, principalmente a do hálux (CHERNOFF; SCHER, 2016; TUCKER, 2015), e desencadeia diversos danos físico à unha, além de proporcionar dor, problemas estéticos, bem como redução de autoestima e perda da habilidade de desempenhar tarefas no trabalho (BIESBROECK; FLECKMAN, 2015; GREGORY, 1996).

A *tinea unguium* pode ser classificada clinicamente em cinco tipos: onicomicose subungueal distal lateral, onicomicose subungueal proximal, onicomicose branca superficial, onicomicose distrófica total e paroníquia (Figura 3) (GATICA et al., 2017; MOYANO; ERCHIGA; PILAR, 2016; BHATTA et al., 2016; ROBERTS; TAYLOR; BOYLE, 2003) que podem ser assim discriminadas:

- Onicomicose subungueal proximal (Figura 3A) é caracterizada pela destruição da lúnula com a formação de manchas brancas e danos à lâmina ungueal. Geralmente os principais causadores são as espécies de *T. rubrum* e *C. albicans* (MOYANO; ERCHIGA; PILAR, 2016; WELSH; VERA-CABRERA; WELSH, 2010; WESTERBERG; VOYACK, 2013).

- Onicomicose subungueal distal e lateral (Figura 3B) é o caso mais comum que acomete as unhas. A infecção inicia-se na parte distal com mudança de coloração, hiperqueratose e desprendimento da lâmina ungueal, sendo o *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* seus agentes infecciosos (CANESCHI,

2013; MOYANO; ERCHIGA; PILAR, 2016; WELSH; VERA-CABRERA; WELSH, 2010; WESTERBERG; VOYACK, 2013).

- Onicomicose branca superficial (Figura 3C) é um tipo mais raro de ocorrência, caracteriza pela formação de placas brancas na lâmina ungueal ocasionadas pelo *T. mentagrophytes* (MOYANO; ERCHIGA; PILAR, 2016; WELSH; VERA-CABRERA; WELSH, 2010; WESTERBERG; VOYACK, 2013).

- Onicomicose distrófica total (Figura 3D) é considerada um estágio avançado dos três tipos anteriormente mencionados, uma vez que há destruição total da lâmina ungueal (MOYANO; ERCHIGA; PILAR, 2016; WELSH; VERA-CABRERA; WELSH, 2010).

- Onicomicose paroníquia (Figura 3E) é ocasionada pela levedura *C. albicans* que proporciona a inflamação das bordas laterais e proximais podendo estar associada a infecções por bactérias como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* (TUCKER, 2015).



Figura 3: Representação clínica das onicomicoses.

A: Onicomicose subungueal proximal; B: Onicomicose subungueal distal e lateral, C: Onicomicose branca superficial, D: Onicomicose distrófica total e E: Paroníquia.

Fonte: Adaptado de Moyano, Erchiga; Pilar, (2016); Tucker (2015).

Inúmeras causas podem favorecer seu desenvolvimento, entre os principais está o contato constante com umidade, solo e vegetais; uso de calçados fechados por longos períodos, atividade laboral desempenhada diariamente (manicure, jardineiro, faxineira, atleta, agricultores, manipuladores de alimentos, entre outras), a predisposição genética e pacientes com o sistema imunológico comprometido (WELSH; VERA-CABRERA; WELSH, 2010; REEDY; BASTIDAS; HEITMAN, 2007; PANNU et al., 2009; MCCARTHY, 2004; PAKSHIR et al., 2013). Soma-se a estas condições a utilização de ambientes coletivos como banheiros públicos, vestiários e piscinas, traumas na

região ungueal e o contato direto com animais de estimação, pessoas e objetos infectados (IMBERT et al., 2016; PURIM et al., 2006; TUCKER, 2015).

A prevalência desta infecção é de 26 % em pacientes com *diabetes mellitus*, 23,2 % em pessoas VIH-positivos, 24 % em portadores de lúpus eritematoso e 20 a 30 % em pacientes com psoríase (SOLTANI et al., 2015).

Os principais agentes etiológicos são os fungos filamentosos dermatófitos e os leveduriformes (ARAIZA-SANTIBÁNEZ et al., 2016; MCCARTHY, 2004; PAKSHIR et al., 2013; SAI DEVI et al., 2012). Entre os primeiros, as espécies de *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum* e *Epidermophyton floccosum* são as mais isoladas (MCCARTHY, 2004; WELSH; VERA-CABRERA; WELSH, 2010), e entre as leveduras está a *Candida albicans* (MCCARTHY, 2004; MURDAN, 2002; PAKSHIR et al., 2013). Outro grupo de fungos que pode ser identificado nesta infecção, mas em menor frequência, é o dos fungos filamentosos não-dermatófitos, como os pertencentes ao gênero *Fusarium* (SHAH; DALAL; MODAK, 2016; VILA; ROZENTAL; SÁ GUIMARÃES, 2015).

### 3.2.1 Agente etiológico

#### 3.2.1.1 Fungo filamentoso dermatófito

Os dermatófitos são fungos filamentosos ubíquos; apresentam filamentos tubulares ramificados e septados denominados hifas, as quais, quando agrupadas, formam o micélio e possuem a capacidade de sofrer pleomorfismo (mudança das características fenotípicas) em colônias mais velhas (BROOKS et al., 2012; LEMSADDEK, 2008; TRABULSI et al., 2015). São micro-organismos queratinofílicos com capacidade de colonizar as unhas, o cabelo e a epiderme, sendo a principal causa de infecção fúngica de tecidos superficiais em seres humanos (GIUDICE, 2008; MONOD et al., 2002; REEDY; BASTIDAS; HEITMAN, 2007; YOUNGCHIM et al., 2011).

Os dermatófitos são divididos em três categorias de acordo com o seu habitat: antropofílicos (humanos), zoofílicos (animais) e geofílicos (solo). Sobrevivem preferencialmente à temperaturas na faixa de 25 – 28 °C, sendo

formado por espécies dos gêneros *Trichophyton*, *Epidermophyton* e *Microsporum* (DIEGO, 2011; YOUNGCHIM et al., 2011).

#### 3.2.1.1.1 Gênero *Trichophyton*

Entre os dermatófitos, *Trichophyton* é o gênero mais frequentemente isolado em patologias humanas (DIEGO, 2011). Os micro-organismos deste gênero apresentam colônias com aspecto algodinoso, pulverulentas ou lisas e cerosas. Sua superfície é geralmente branca, amarelada ou mais raramente cor-de-rosa a roxa. No verso da colônia é possível encontrar diversas colorações (branca, avermelhada ou marrom) que variam de acordo com a espécie. Geralmente, as espécies isoladas apresentam numerosos microconídios esféricos aderidos à parede das hifas ou agrupados em cachos, e raros macroconídios. Estes apresentam paredes lisas e finas com 1 a 12 septos e com tamanhos e formatos diversos (alongados, claviforme, esférico a alongado) (OLIVEIRA, 2014).

##### 3.2.1.1.1.1 *Trichophyton mentagrophytes*

Trata-se de um complexo caracterizado por espécies de fungos filamentosos hialinos, septados e queratinolíticos da família Arthrodermataceae. Compreendem três espécies: *Arthroderma benhamiae*/*Trichophyton erinacei*, *Arthroderma vabbreuseghemii*/*Trichophyton interdigitale* e *Arthroderma simii*/*Trichophyton mentagrophytes*-*Trichophyton* sp (forma sexuada/assexuada, respectivamente) (DROUOT et al., 2009). A identificação e diferenciação destas espécies ocorre apenas por meio da análise de sequências da região de separador transcrito interno (ITS) do RNAm (RIVAS; MÜHLHAUSER, 2015). São espécies zoofílicas ou antropofílicas responsáveis por inúmeros tipos de dermatomicoses (ITOI et al., 2012).

Os fungos desse complexo apresentam crescimento por volta de 6 – 11 dias após semeadura, com colônias planas, brancas a creme, algodinosas e o reverso com pigmentação amarelada ou acastanhada (Figura 4) (DIEGO, 2011). Possuem hifas hialinas e septadas, microconídios em formato esférico ou semi-esféricos aderidos às hifas e macroconídios, quando presentes, em

formato de clava e multisseptados com dimensões de 4 – 8  $\mu\text{m}$  por 20 – 50  $\mu\text{m}$  (Figura 5) (PEREIRA, 2009; RIVAS; MÜHLHAUSER, 2015).

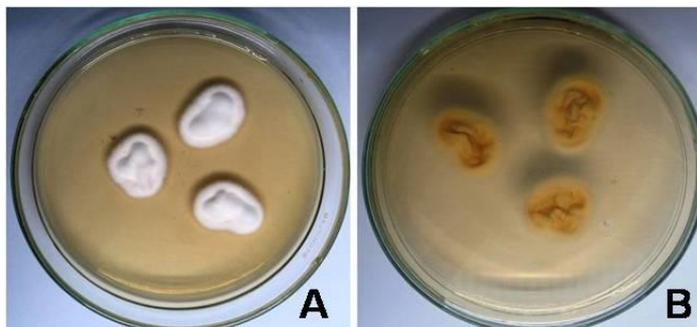


Figura 4: Colônias de *Trichophyton mentagrophytes*.

A: Anverso da colônia; B: reverso da colônia.

Fonte: Adaptado de Caneschi (2013).

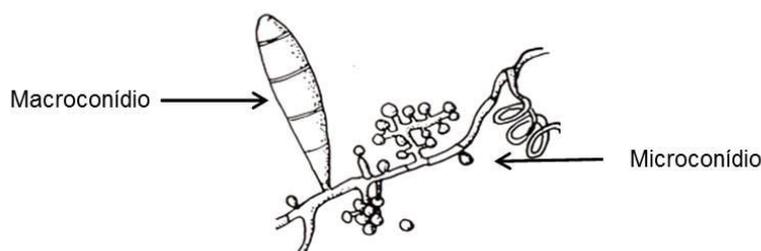


Figura 5: Aspectos micromorfológicos de *Trichophyton mentagrophytes*.

Fonte: Adaptado de Larone (1995).

#### 3.2.1.1.1.2 *Trichophyton rubrum*

*T. rubrum* é uma espécie antropofílica, sendo responsável por cerca de 80 % dos casos de onicomicoses (CAMPOS et al., 2006; OTA, 2017; PERSINOTI, 2012). Apresenta colônia lisa, algodonosa de coloração branca a creme com crescimento entre 7 e 12 dias após sementeira, podendo adquirir coloração marrom no reverso da colônia (Figura 6) (DIEGO, 2011; SILVEIRA, 2007).

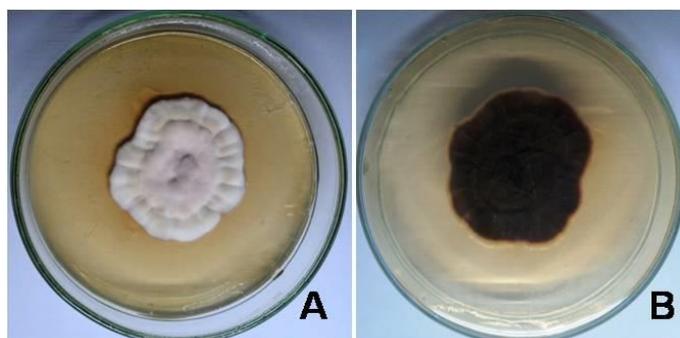


Figura 6: Colônia de *Trichophyton rubrum*.

A: Anverso da colônia; B: reverso da colônia.

Fonte: Adaptado de Caneschi (2013).

Nesta espécie é possível observar grande número de microconídios com 2 – 3  $\mu\text{m}$  por 3 – 5  $\mu\text{m}$  de tamanho aderidos ao longo das hifas ou em formato de cachos. Os macroconídios, quando presentes, revelam aspecto cilíndrico e claviforme com duas a nove septações (Figura 7) (OYEKA, 2000).

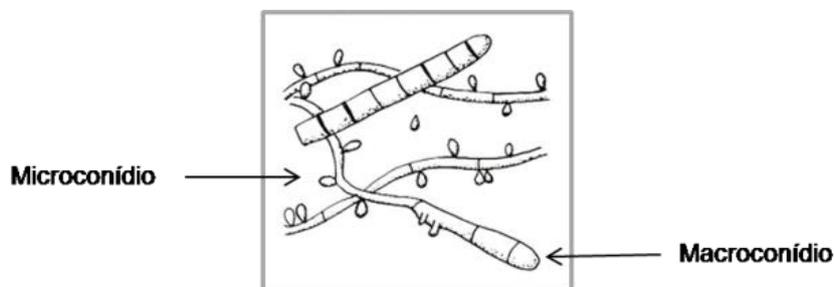


Figura 7: Aspectos micromorfológicos de *Trichophyton rubrum*.  
Fonte: Adaptado de Larone (1995).

### 3.2.1.1.2 Gênero *Epidermophyton*

O gênero *Epidermophyton* é composto pelas espécies antropofílicas *Epidermophyton stockdaleae* e *E. floccosum*, sendo esta última a de importância humana (MCCARTHY, 2004). Seus membros possuem crescimento entre 7 e 10 dias e apresentam macroscopia com colônias de superfície aveludada e algodonosa, plana ou elevada e dobrada no centro, geralmente com coloração amarelo-acastanhado ou branca (quando sofrem pleomorfismo) com o reverso das colônias acastanhado a alaranjado (Figura 8).

Microscopicamente, caracterizam-se pela ausência de microconídios, e macroconídios em grande número, com comprimento de 20 – 60  $\mu\text{m}$  e diâmetro de 4 – 13  $\mu\text{m}$ , 1 – 9 septos com paredes lisas, finas e claviformes, semelhantes a raquetes de tênis (Figura 9) (DIEGO, 2011; OLIVEIRA 2014; WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995).



Figura 8: Colônias de *Epidermophyton floccosum*.  
A: Anverso da colônia; B: reverso da colônia.  
Fonte: Adaptado de Caneschi (2013).

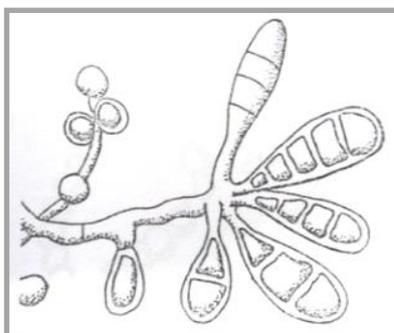


Figura 9: Aspectos micromorfológicos de *Epidermophyton floccosum*.  
Fonte: Adaptado de Larone (1995).

### 3.2.1.2- Fungos leveduriformes

*Candida* spp. pertence ao grupo de fungos leveduriformes não dermatófitos responsável pelo desenvolvimento de patologias como candidemias e a onicomicose. Entre as inúmeras espécies deste gênero, *C. albicans* representa cerca de 70 % dos diagnósticos de *tinea unguium* causadas por leveduras (BHATTA; KEYAL; WANG, 2016; METIN; DILEK; DEMIRSEVEN, 2015). Porém, existem outras espécies que compõem este gênero: *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. sake*, *C. haemulonii*, *C. famata* e *C. zeylanoides* (AKÇAĞLAR; ENER; TÖRE, 2011; BROOKS et al., 2012).

*C. albicans* é um fungo patogênico oportunista, a qual pode ser encontrada naturalmente em mucosas e tratos gastrointestinais e geniturinários de indivíduos saudáveis (CALDERONE; FONZI, 2001; HUBE et al., 2015). São seres unicelulares com formato ovoide com tamanho entre 3 – 6  $\mu\text{m}$  e se reproduzem assexuadamente por brotamento e divisão binária simples, que

permite a formação das pseudo-hifas, além de apresentarem a capacidade de formação do tubo germinativo e hifas verdadeiras (Figura 10) (AKÇAĞLAR; ENER; TÖRE, 2011). Macroscopicamente é possível observar sua textura e consistência cremosa, superfície lisa e coloração branca ou bege (Figura 11). Desenvolvem-se em período de 24 a 48 horas à 37 °C (BROOKS et al., 2012).

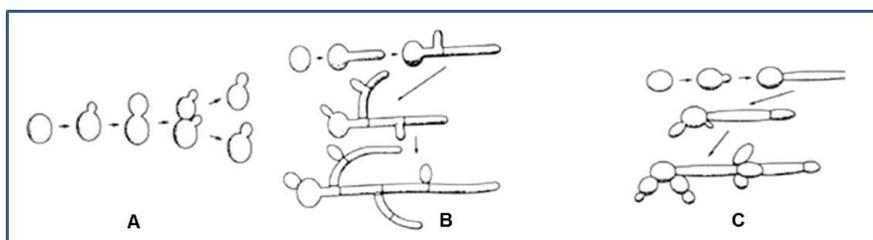


Figura 10: Aspectos microscópicos de *Candida albicans*.

A: Brotamento. B: Pseudo-hifa e C: Hifa.

Fonte: [https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/C.albicans\\_\(Pathogenesis\)](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/C.albicans_(Pathogenesis))

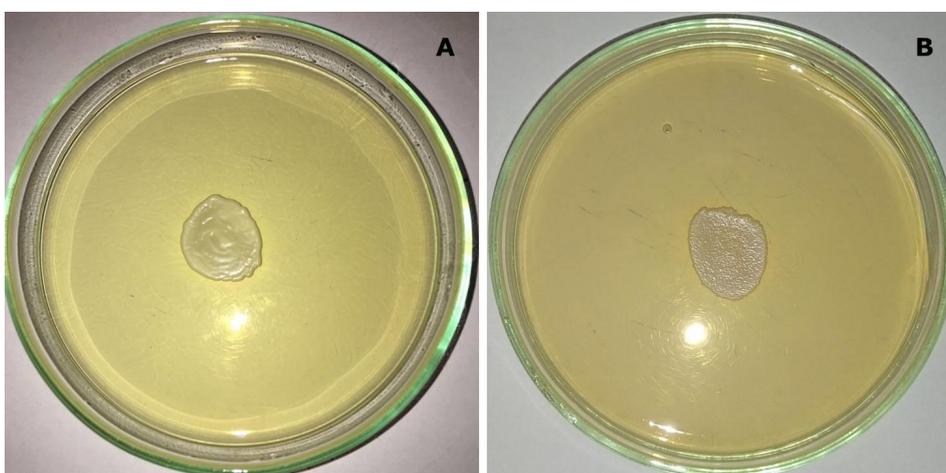


Figura 11: Aspectos macroscópicos de: (A): *Candida albicans* ATCC 10231 e (B) isolado clínico de *Candida albicans*.

Fonte: O autor (2018).

### 3.2.2 Fatores de virulência

Os fungos são micro-organismos que apresentam diversas estratégias que permitem sua fixação e infecção na pele e seus anexos (cabelo, pelo e unha). Estas são denominadas fatores de virulência.. Entre esses podemos destacar a capacidade de excretar enzimas, a fim de propiciar condições favoráveis para a degradação do substrato e fornecimento de nutrientes para sua nutrição (ALIPOUR; MOZAFARI, 2015; RAMOS et al., 2015).

Dentre essas enzimas excretadas por fungos, quer seja filamentosos ou leveduriformes, estão as queratinase, fosfolipase, elastase, colagenase e lipases (AKTAS; YIGIT, 2015; GIUDICE et al., 2012; ISHIDA et al., 2012; MONOD et

al., 2002; MUHSIN; AUBAID, 2000; MUHSIN; AUBAID; AL-DUBOON, 1997; OYEKA, 2000; PERES et al., 2010a; SHARMA; SHARMA, 2011).

As enzimas hidrolíticas, como a fosfolipase, destroem ou desorganizam os elementos da membrana celular das células hospedeiras, o que ocasiona danos à membrana como a formação de poros, que permite a entrada de hifas no citoplasma (IBRAHIM et al., 1995; ISHIDA et al., 2012; MATTEI et al., 2013).

Os fungos dermatófitos possuem a capacidade de invadir tecidos queratinizados, sendo esta característica favorecida pela excreção de proteases como a queratinase, o que justifica sua patogênese (CHEN et al., 2010; MONOD et al., 2002; OUF et al., 2016; OYEKA, 2000; RIFFEL, 2006; SANYAL; DAS; BANERJEE, 1985; TSUBOI et al., 1989). Assim, esses fungos possuem a capacidade de romper as ligações dissulfeto e utilizar a queratina como fonte de carbono e nitrogênio para seu crescimento e desenvolvimento (ANBU et al., 2008; VIANI et al., 2001).

Já na espécie de *C. albicans*, é possível evidenciar a produção de diversos fatores de virulência como a formação de tubo germinativo, estratégias de adesão ao substrato, variabilidade genotípica e fenotípica e enzimas extracelulares (AKÇAĞLAR; ENER; TÖRE, 2011; BERNARDES et al., 2012; MATTEI et al., 2013; POZZATTI et al., 2010; RICETO et al., 2014). Essa é considerada uma das espécies mais virulentas do gênero, dado que se justifica pela sua capacidade de transformar blastóporo em hifa, dando início, por tanto, à forma filamentosa (ELLEPOLA; SAMARANAYAKE, 2000; HUBE et al., 2015; OLIVEIRA et al., 1998).

A fosfolipase é uma enzima amplamente produzida por fungos dermatófitos e que auxilia no estabelecimento da infecção (PERES et al., 2010b). Sua produção é controlada pelo gene PLB1 e considerada um dos mais importantes fatores de virulência em isolados de *C. albicans* (CHAFFIN et al., 1998; PEREIRA, et al., 2011; SACHIN; RUCHI; SANTOSH, 2012). Está localizada na superfície celular, assim como na extremidade de seu tubo germinativo. Já foram descritos quatro tipos de fosfolipases (A, B, C e D), as quais atuam na hidrólise dos fosfolipídios de membrana e ocasionam danos à célula epitelial (AKÇAĞLAR; ENER; TÖRE, 2011; OLIVEIRA et al., 1998; PATEL; GULUBE; DUTTON, 2009).

Outro importante fator de virulência é a melanina, cuja produção pode ser identificada em diversos seres vivos como bactérias, fungos, plantas e animais. Este pigmento possui inúmeras funções como a capacidade de contribuir com a patogênese e virulência fúngica (ALMEIDA-PAES et al., 2016; TEIXEIRA et al., 2010). A melanina está localizada na parede celular dos fungos e pode ser caracterizada como pigmento de elevado peso molecular, usualmente insolúvel em água e que revela coloração marrom escuro ou preto (CUNHA et al., 2010; FUENTES et al., 2014; JACOBSON, 2000). Possui a capacidade de realizar o sequestro de radicais oxidativos do oxigênio, por conseguinte torna os fungos mais resistentes aos mecanismos de defesa do hospedeiro, às drogas antifúngicas e à radiação ultravioleta (KAJISHIMA, 2009; YU et al., 2015).

Semelhante às bactérias, fungos filamentosos e leveduriformes também podem produzir biofilme, outra condição associada à virulência e que pode ser definido como camadas multicelulares agrupadas (Figura 12) (GUPTA; DAIGLE; CARVIEL, 2016; HARDING et al., 2009; MONTEIRO et al., 2015).

Os fungos produzem podem produzir hifas invasivas, fundamentais para a penetração no tecido alvo para reprodução e nutrição. Este comportamento ocorre sempre que expostos a elevada umidade e que possuem substrato para obtenção de nutrientes, o que pode ser verificado nas infecções de pele e unhas por dermatófitos. Basicamente, ocorre a adesão à superfície alvo, seguida da germinação dos esporos e crescimento celular. Posteriormente, há crescimento exponencial do número de células até atingir a maturidade necessária, ou seja, o biofilme completo, para iniciar a dispersão da espécie por meio de esporos. Dessa forma, são formados os biofilmes que podem ser encontrados em tecidos acometidos por fungos filamentosos e leveduriformes (HARDING et al., 2009). O biofilme confere ao micro-organismo considerável resistência a ação de substância sobre sua estrutura, comportando como uma barreira física, o que está possivelmente relacionada à resistência antifúngica e recidivas (GUPTA; DAIGLE; CARVIEL, 2016).

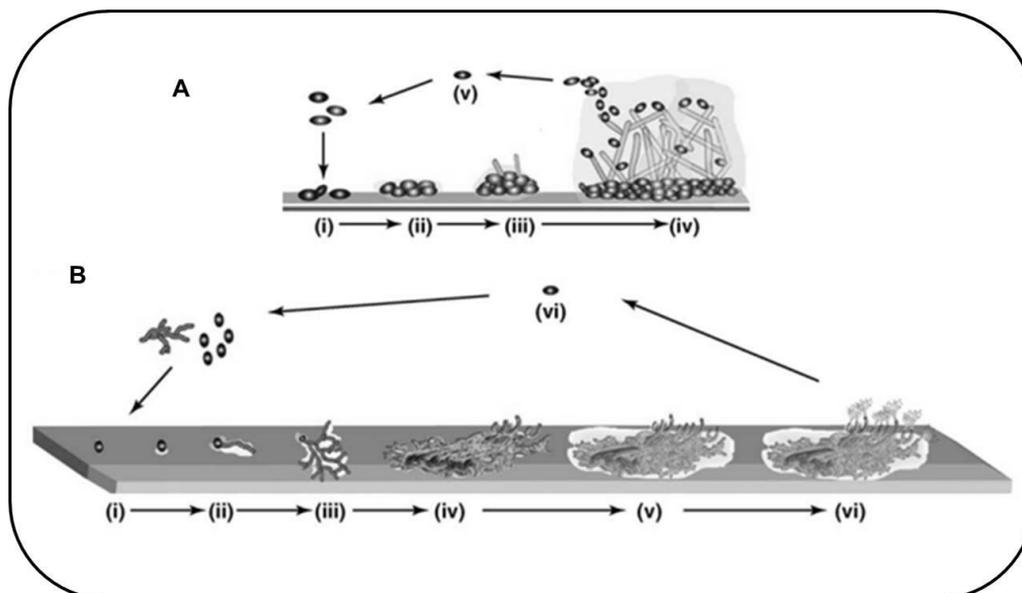


Figura 12: Modelo de biofilme desenvolvido por leveduras e fungos filamentosos.

A: Levedura: (i) adsorção, (ii) adesão, (iii) formação de microcolônias, (iv) biofilme maduro, e (v) dispersão. B: Fungo filamentoso: (i) adsorção, (ii) ligação ativa, (iii) micro-colônia I (germinação), (iv) micro-colônia II (desenvolvimento micelial), (v) desenvolvimento do biofilme maduro, e (vi) dispersão ou fase planctônica.

Fonte: Adaptado de Harding e colaboradores (2009).

### 3.3 Diagnóstico das onicomicoses

Mesmo com o avanço da medicina laboratorial, o diagnóstico de onicomicoses ainda apresenta grandes dificuldades e limitações para os profissionais da área (CHERNOFF; SCHER, 2016). Assim, torna-se necessária a combinação entre o diagnóstico clínico e laboratorial com a identificação do agente etiológico envolvido na infecção (DA CUNHA; FONTAO, 2016; SOLTANI et al., 2015).

#### 3.3.1 Diagnóstico clínico

O diagnóstico clínico consiste na análise visual do tecido ungueal de forma superficial e não invasiva, sendo caracterizada a lesão, condições e hábitos de vida do paciente, bem como de seus antecedentes familiares. Há necessidade de identificação de patologias correlatas, além da avaliação de tratamentos específicos realizados anteriormente (PURIM, 2006).

### 3.3.2 Diagnóstico laboratorial

Tradicionalmente, os métodos de diagnóstico laboratorial das onicomicoses incluem a microscopia direta e cultura microbiológica do material ungueal do paciente, contudo, estes apresentam limitações (GORDON et al., 2016).

A análise microscópica apresenta reduzida especificidade e sensibilidade, além de depender do analista, o que ocasiona 15 % de resultados falsos negativos (WISSELINK; ZANTEN; KOOISTRA-SMID, 2011). Por outro lado, embora a cultura microbiológica seja considerada padrão-ouro para este diagnóstico, seu resultado é dependente do fornecimento de uma amostra adequada e pode demorar de 2 a 6 semanas (GORDON et al., 2016).

Outras estratégias estão sendo empregadas para auxiliar no diagnóstico da onicomicose, mas este ainda apresenta grandes dificuldades (BONIFAZ et al., 2013).

#### 3.3.2.1 Microscopia óptica direta

A microscopia direta corresponde a um diagnóstico presuntivo, complementar e rápido, mas apresenta considerável relevância para o diagnóstico. Todavia, não é aconselhável substituir a realização da cultura microbiológica por esse método (BONIFAZ et al., 2013). É importante ressaltar que o paciente não pode estar em uso de antifúngicos no período que antecede a coleta, uma vez que pode proporcionar resultado falso negativo (BRASIL, 2013).

Após a coleta do material biológico, deve-se colocar uma gota de solução de hidróxido de potássio (KOH) a 10 – 20 % (BRASIL, 2013; DIEGO, 2011) em uma lâmina de microscopia e sobre esta, a amostra a ser examinada (HAJAR et al., 2016). Em seguida, deve-se adicionar uma gota de solução de azul de algodão e levar ao microscópio óptico para análise nas objetivas de 20 e 40 vezes (BRASIL, 2013; EMAM; EL-SALAM, 2016; HAJAR et al., 2016).

Na análise micromorfológica, observam-se a presença de hifas, forma e disposição dos macroconídios, microconídios e eventuais estruturas de ornamentação para fungos filamentosos. Em leveduras ocorre a presença de células ovoides e hifas (PEREIRA, 2009).

### 3.3.2.2-Diagnóstico por cultura microbiológica

Este método é amplamente empregado na rotina laboratorial, entretanto, demanda longo tempo para conclusão, laborioso com chance de contaminações e resultados falso-negativos (60 %) (HAJAR et al., 2016).

O material clínico coletado deve ser inoculado em meio de cultura microbiológica, de acordo com a suspeita clínica e um dos meios utilizados é o ágar *Sabouraud* dextrose (SDA) acrescido de cloranfenicol (0,05 %). Este deve permanecer incubado a 25 - 30 °C por, no mínimo, 30 dias, sendo avaliados diariamente para evidenciar a formação de colônias. Quando o crescimento fúngico for identificado é necessário realizar uma avaliação macroscópica (aspecto e produção de pigmentos) e microscópica do mesmo (BRASIL, 2013; DIEGO, 2011; PEREIRA, 2009).

Em casos de crescimento e isolamento de *Candida* spp., deve-se empregar CHROMágar *Candida* para auxiliar na identificação de *C. albicans* e demais espécies (ARAIZA-SANTIBÁNEZ et al., 2016).

### 3.3.2.3-Diagnóstico pelo ácido periódico de Schiff

Trata-se de um método histológico empregando o corante ácido periódico de Schiff (APS) (WESTERBERG; VOYACK, 2013) o qual cora células removidas da região acometida. Possui elevada sensibilidade (80 - 90 %), especialmente em casos previamente tratados com antifúngico (GATICA et al., 2017; MOYANO; ERCHIGA; PILAR, 2016). Porém, é invasivo, de preparo difícil e demorado, além de não ser específico para dermatófitos (HAJAR et al., 2016; WESTERBERG; VOYACK, 2013).

## 3.4 Tratamento das onicomicoses

Fungos e seres humanos são seres eucariotos e apresentam semelhanças estruturais entre suas células, o que culmina na necessidade de medicamentos com elevada especificidade, a fim de reduzir seus efeitos tóxicos (MORACE; PERDONI; BORGHI, 2014). Uma das diferenças entre estes seres está na membrana celular fúngica, a presença do ergosterol, principal alvo de ação dos antifúngicos (PERSINOTI, 2012).

O tratamento das onicomicoses é considerado oneroso e um grande desafio para a medicina, visto que o diagnóstico é tardio e muitas vezes equivocado (BIESBROECK; FLECKMAN, 2015; SIMIC et al., 2016), há reduzida adesão do paciente à terapia e, conseqüentemente, demanda longos períodos de tratamento, tendo ainda a dificuldade de permeação do fármaco através do tecido ungueal (CHAUVIN, 2011; PASKIABI et al., 2017; ROCHA et al., 2017).

Este tecido possui reduzida vascularização e representa uma grande barreira para o contato do medicamento de uso tópico com o fungo, o que reduz, muitas das vezes, a eficácia do mesmo. Já a terapia oral pode atingir o alvo com eficácia, no entanto, ocasionam inúmeros efeitos adversos ao paciente. Assim, em muitos dos casos a melhor estratégia empregada é a associação entre medicamentos de via tópica e sistêmica (ALOMRANI; AL-AGAMY; BADRAN, 2015; IORIZZO, 2015).

O tratamento padrão ocorre por meio de medicamentos administrados por via tópica (amorolfina e ciclopirox) (PERES et al., 2010a) e oral/sistêmica (terbinafina, cetoconazol e itraconazol) (DIEGO, 2011; KOZAREV; VIZINTIN, 2010; PANNU et al., 2009; TUCKER, 2015). Em contrapartida, estes proporcionam efeitos adversos, dentre os quais merecem destaque a hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e casos de neurotoxicidade (BIESBROECK; FLECKMAN, 2015; KHAN; AHMAD, 2011). Há uma estimativa de gasto mundial de mais de 500 milhões de Dólares anualmente com o tratamento de dermatomicoses (GUPTA; KAR, 2015).

#### 3.4.1 - Derivados azólicos

Na classe dos azóis, os principais fármacos de escolha para o tratamento das onicomicoses são cetoconazol e itraconazol (ELSAYED, 2015; KERAI et al., 2016). Quimicamente, são divididos em imidazóis (dois átomos de nitrogênio no anel azólico): cetoconazol (Figura 13 A), clotrimazol, miconazol, entre outros e os triazóis (três átomos de nitrogênio no anel azólico): fluconazol, itraconazol (Figura 13 B), variconazol, posaconazol (NETT; ANDES, 2016; TANG; WANG, 2018).

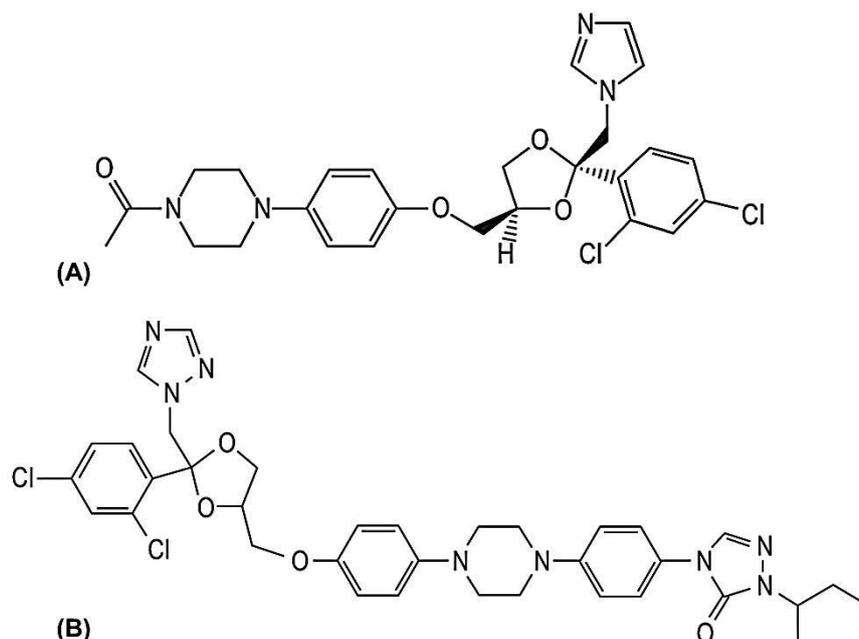


Figura 13: Estrutura química dos principais representantes dos azóis.  
A: cetoconazol e B: itraconazol.  
Fonte: Adaptado de Brooks e colaboradores (2012).

Estes atuam na biossíntese do ergosterol ao inibir a enzima 14- $\alpha$ -demetilase presente no citocromo P450, enzima responsável pela remoção oxidativa do grupo 14- $\alpha$ -metil do lanosterol (Figura 14) (DELARZE; SANGLARD, 2015; PEREIRA, 2009) e, conseqüentemente, ocasiona danos à estrutura e função da membrana celular, o que resulta na inibição do crescimento e alterações morfológicas (TATSUMI et al., 2013).

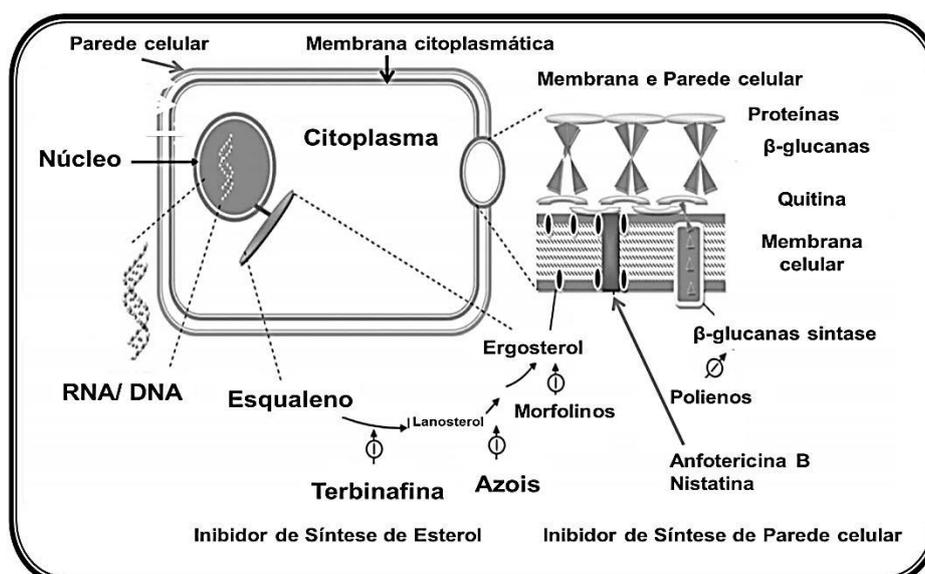


Figura 14: Mecanismos de ação das principais classes de antifúngicos.  
Fonte: Adaptado de Kathiravan e colaboradores (2012).

Um dos principais gargalos para a utilização desta classe farmacológica remete aos efeitos adversos por eles proporcionados. Podem ocasionar danos gastrintestinais e toxicidade hepática fatal (KATHIRAVAN et al., 2012; MURDAN, 2016; TUCKER, 2015). Além disso, esses podem interagir com outros fármacos de uso oral, o que limita seu uso em pacientes com comorbidades distintas de micoses (MURDAN, 2016).

### 3.4.2 Alilaminas

São inibidores não competitivos da esqualeno epoxidase, enzima envolvida da síntese de esteróis (Figura 14). Ocasionam o acúmulo de esqualeno que proporciona danos à estrutura e função da membrana fúngica. Seus principais representantes são a terbinafina e naftifina (PEREIRA, 2009; RANG et al., 2007). Destaque para a terbinafina por estar entre os principais agentes terapêuticos de escolha para o tratamento das onicomicoses (Figura 15), com taxa de cura de cerca de 75 % e 33 % de recidivas (CHERNOFF; SCHER, 2016; MADDY; TOSTI, 2017).

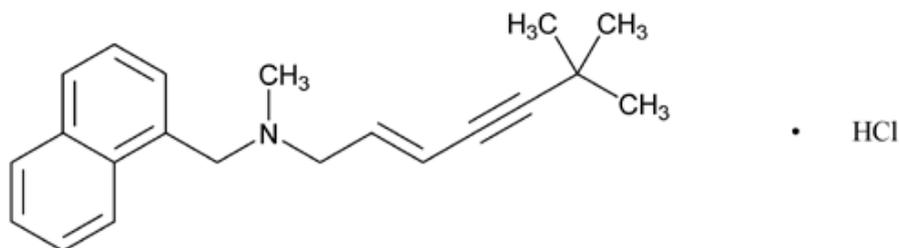


Figura 15: Estrutura química do cloridrato de terbinafina.  
Fonte: Adaptado de Brooks e colaboradores (2012).

A terbinafina é caracterizada como fungicida e considerada mais efetiva que o itraconazol e fluconazol, além de possibilitar a administração conjunta com outros medicamentos, uma vez que apresenta reduzidos efeitos colaterais ou tóxicos (distúrbios gastrintestinais e alterações do paladar) (DIEGO, 2011; DIOGO et al., 2010; IORIZZO, 2015).

### 3.4.3 Morfolinos

A classe dos morfolinos é composta pelo fármaco sintético denominado amorolfina (Figura 16), que é amplamente empregado na terapia tópica contra as onicomicoses. Atua em dois sítios específicos ( $\Delta^7$  e  $\Delta^8$  isomerase e na  $\Delta^{14}$  redutase) que inibem a converção de lanosterol em ergosterol (Figura 14) (KATHIRAVAN et al., 2012; WELSH; VERA-CABRERA; WELSH, 2010).

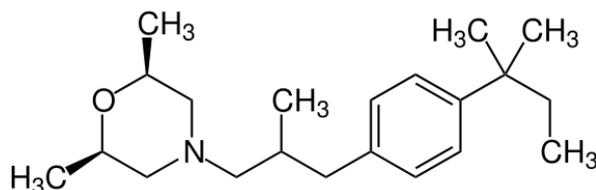


Figura 16: Fórmula estrutural da amorolfina.

Fonte: Adaptado de Oliveira (2012a).

A amorolfina não só apresenta elevada atividade frente a dermatófitos e leveduras, mas também exerce efeito sinérgico com outros antifúngicos como cetoconazol, itraconazol e terbinafina (ELSAYED, 2015; POLAK-WYSS, 1995), o que a torna uma das principais escolhas para o tratamento de infecções ungueais fúngicas (ELSAYED, 2015; KATHIRAVAN et al., 2012; PERES et al., 2010a; POLAK-WYSS, 1995).

### 3.4.4 Polienos

Os polienos correspondem à classe mais antiga desse grupo farmacológico, ligam-se ao ergosterol presente na membrana celular fúngica e ocasiona a formação de poros que permitem o extravasamento de material intracelular, saída de potássio e a morte celular (Figura 14) (KATHIRAVAN et al., 2012; PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017).

Os principais representantes deste grupo são a anfotericina B e a nistatina (Figura 17). O primeiro é amplamente empregado para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas, com amplo espectro para diversas espécies, quer sejam leveduras ou fungos filamentosos. Não é metabolizado pelas enzimas do citocromo P450 e não apresenta consideráveis casos de interação medicamentosa. Entretanto, proporciona toxicidade renal e hepática (NETT;

ANDES, 2016; PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017).

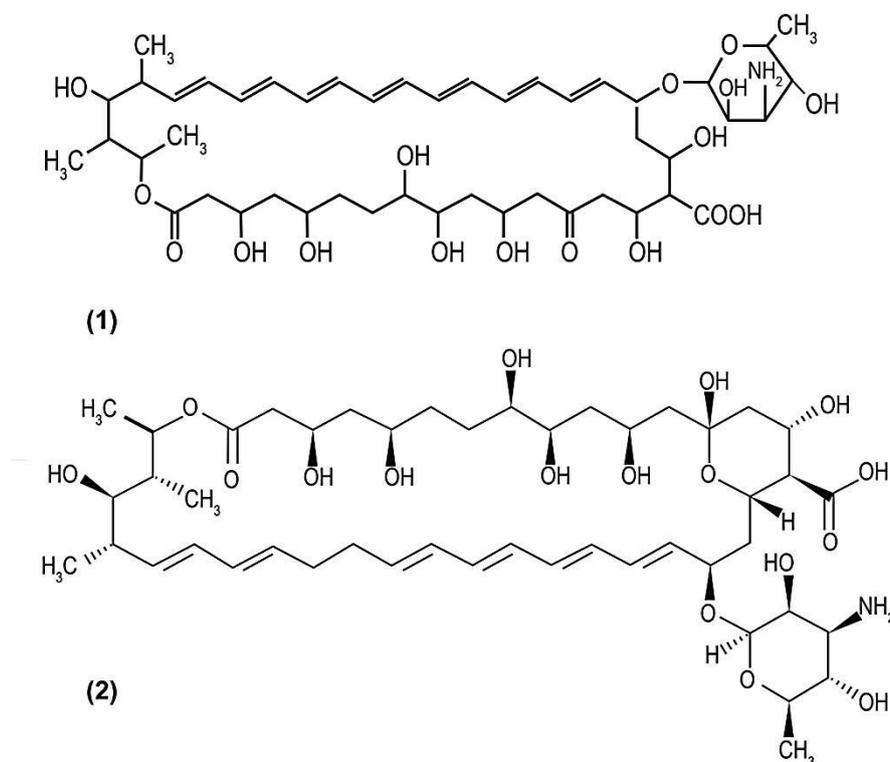


Figura 17: Fórmula estrutural da anfotericina B (1) e da nistatina (2).  
Fonte: Adaptado de Kathiravan e colaboradores (2012).

A nistatina apresenta grande semelhança estrutural com a anfotericina B e compartilham o mesmo mecanismo de ação. Sua administração ocorre por via tópica para o tratamento de infecções por *Candida* spp. superficiais (BONDARYK; KURZAŃKOWSKI; STANISZEWSKA, 2013). Entretanto, seu emprego é limitado ao uso a esta via de administração pela sua elevada toxicidade (BROOKS et al., 2012).

### 3.4.5 Hidroxipiridona

Outro antifúngico para uso tópico amplamente prescrito é o ciclopirox (6-ciclo-hexil-1-hidroxi-4-metil-2 (1H) – piridona) (Figura 18) (CHU; RUBIN, 2014; FELDSTEIN; TOTRI; FRIEDLANDER, 2015). É uma hidroxipiridona sintética de largo espectro. Os grupos hidroxi-substituintes apresentam elevada afinidade por cátions trivalentes ( $Fe^{3+}$ ) que são cofatores essenciais para enzimas, o que implica na interferência no transporte de elétrons mitocondriais importantes da

produção de energia, o que prejudica o metabolismo microbiano (MATOS, 2015). Este, geralmente é utilizado em combinação com antifúngicos orais, como a terbinafina, que proporciona uma taxa de cura de aproximadamente 88 % (WESTERBERG; VOYACK, 2013). É importante ressaltar que não é indicada a monoterapia tópica (IORIZZO, 2015; MOYANO; ERCHIGA; PILAR, 2016).

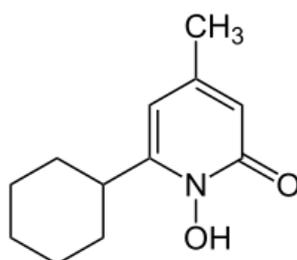


Figura 18: Fórmula estrutural do ciclopirox.  
Fonte: Adaptado de Matos (2015).

#### 3.4.6 Terapias complementares

Existem outras formas de tratamento sem o emprego de medicamentos de forma direta como a terapia fotodinâmica, aplicação química e a remoção da unha (FELDSTEIN; TOTRI; FRIEDLANDER, 2015; MOYANO; ERCHIGA; PILAR, 2016; ROBRES et al., 2015; TARDIVO; WAINWRIGHT; BAPTISTA, 2015).

A terapia fotodinâmica consiste na aplicação de um feixe de luz, a determinado comprimento de onda, diretamente sobre a região ungueal acometida juntamente com um componente químico fotossensibilizante. Este agente aplicado tópica ou sistematicamente, gera espécies reativas de oxigênio (ROS) que iniciam a destruição de células por necrose ou apoptose, após ser excitado pela luz aplicada (BHATTA; KEYAL; WANG, 2016; LÓPEZ-CHICÓN et al., 2016; ROBRES et al., 2015; TARDIVO; WAINWRIGHT; BAPTISTA, 2015).

Outra terapia alternativa ocorre por meio do uso de componentes químicos que ocasionam a destruição da unha para facilitar a ação dos antifúngicos. São empregadas formulações tópicas contendo creme de ureia 20 % ou 40 %, juntamente com ácido salicílico a 10 % (MOYANO; ERCHIGA; PILAR, 2016).

Já a remoção da placa ungueal é um procedimento cirúrgico no qual é realizada a retirada parcial ou total da unha. É recomendado apenas quando há resistência aos antifúngicos para auxiliar na terapia tópica (FELDSTEIN; TOTRI; FRIEDLANDER, 2015; MOYANO; ERCHIGA; PILAR, 2016; PURIM, 2006).

Em 2014, foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) novo fármaco para tratamento tópico das onicomicoses, o *tavaborole* (Figura 19), cujo mecanismo de ação corresponde à inibição da síntese proteica (BIESBROECK; FLECKMAN, 2015; ELEWSKI et al., 2015; ELSAYED, 2015; FLICK et al., 2016).

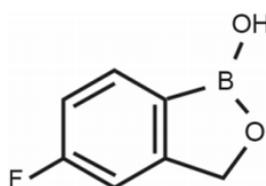


Figura 19: Fórmula estrutural do tavaborole.  
Fonte: Adaptado de Elewski e colaboradores (2015).

### 3.5 Resistência microbiana aos agentes antifúngicos

O tratamento medicamentoso com antifúngicos, embora pouco descrito, promove a seleção de micro-organismos resistentes com capacidade de sobreviver e reproduzir na presença de determinado fármaco (MORACE; PERDONI; BORGHI, 2014). A resistência a antifúngicos recebe menor atenção quando comparada à bacteriana, o que pode ser justificado pelo fato de as micoses serem doenças negligenciadas, mas o número de recidiva vem aumentando (DELARZE; SANGLARD, 2015; PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017).

Em muitos casos, as recidivas fúngicas são atribuídas à incapacidade do antifúngico de penetrar no local da infecção, e não resultante da resistência intrínseca ou adquirida do fungo (ALIPOUR; MOZAFARI, 2015). Todavia, esta circunstância nem sempre é verdade, uma vez que diversos mecanismos de resistência já foram identificados em dermatófitos e *Candida* spp.. De forma geral, os principais mecanismos que contribuem para a resistência aos antifúngicos remetem à modificação ou degradação metabólica do fármaco,

com a redução de sua captação pelo fungo; alterações na interação com o sítio alvo, por meio de mutações pontuais, amplificação e conversão gênica (recombinação) e aumento do efluxo celular (MARTINS et al., 2017; NETT; ANDES, 2016; PERES et al., 2010a).

Na espécie *T. rubrum* já foram identificados dois transportadores relacionados ao efluxo celular, *TruMDR1* e *TruMDR2*, os quais são cruciais na produção de enzimas que favorecem sua patogenicidade e no processo de resistência a diversos antifúngicos (KOMOTO et al., 2015; PERES et al., 2010a).

Entre as espécies de *Candida* spp. há a formação de biofilme, o qual se comporta como uma barreira para a entrada dos antifúngicos, episódio que representa um grave problema no contexto da ineficácia desses fármacos (MONTEIRO et al., 2015; MORACE; PERDONI; BORGHI, 2014). É necessário mencionar o aumento do efluxo de agentes antifúngicos, devido à sobre-expressão de genes CDR1 e CDR2 (família de proteínas transportadoras de membrana do tipo ABC) (IBRAHIM et al., 2015). Estes e outros elementos estão atraindo maior atenção dos profissionais de saúde diante do aumento de casos de cepas resistentes à terapia medicamentosa (EL-HOSSARY et al., 2017; GUIRAO-ABAD et al., 2017; SZCZEPANIAK et al., 2017).

Delarze e Sanglard (2015) definem o termo tolerância aos antifúngicos como a capacidade do micro-organismo sobreviver em concentrações medicamentosas acima da concentração inibitória mínima (CIM). Esta pode estar associada a mutações genéticas, que podem ser impulsionadas pela resistência a elevadas concentrações de fármacos. Por conseguinte, pode desencadear, sob pressão seletiva, alterações em genes específicos. Desta forma, a tolerância aos antifúngicos favorece o surgimento e a persistência de células capazes de sobreviver às terapias medicamentosas e ocasionar as recidivas (DELARZE; SANGLARD, 2015).

Assim, o surgimento de cepas tolerantes e resistentes leva à busca por antifúngicos com mecanismos de ação inovadores, amplo espectro de ação, eficazes, com reduzida toxicidade e excelente biodisponibilidade para o tratamento da onicomicoses (KOKIL et al., 2010; SHAH et al., 2015; SIMIC et al., 2016).

Diante do exposto, o tratamento de micoses e em especial da *tinea unguium* se tornou um grande problema de saúde pública mundial, uma vez que os medicamentos antifúngicos disponíveis ao consumidor estão se tornando a cada dia menos eficazes e, dessa forma, torna-se necessário o desenvolvimento de novos compostos ativos (KHAN; AHMAD, 2011).

Estudos envolvendo compostos amino álcoois e diaminas tem revelado atividade antimicrobiana promissora (AJORI; ANSARI; DARVIZEH, 2015; ALMEIDA et al., 2013), o que impulsiona a avaliação do seu potencial farmacológico diante dos micro-organismos causadores de micose de unha.

### **3.6 Compostos amino álcoois e diaminas**

Os amino álcoois são empregados na química medicinal, a fim de sintetizar compostos biológica e farmacologicamente ativos como pode ser observado em: adrenalina, bloqueadores beta-adrenérgicos, fármacos anti-asmáticos, antibióticos entre outros produtos naturais bioativos. Possuem grande importância atribuída ao seu emprego em sínteses orgânicas de compostos sintéticos e de ocorrência natural. Sua presença é frequentemente associada a atividades biológica com potencial antimicrobiano (ABONIA et al., 2013; ALALLA et al., 2016; ALMEIDA et al., 2013; VANGURU et al., 2017; VIJAY; ANGAYARKANNY; BASKAR, 2008).

Substâncias contendo a unidade amino álcool (Apêndice A) podem apresentar ação antituberculosa ao inibir o crescimento de *M. tuberculosis* (CUNICO et al., 2011; REZENDE JR et al., 2009; TAVEIRA et al., 2007); ação frente à *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* resistente à vancomicina; *Pseudomonas aeruginosa* resistente à novobiocina, *P. vulgaris* (PRIYANKA et al., 2017) e ação antibacteriana de modo geral (SOUZA FERNANDES et al., 2016), além de apresentar reduzida toxicidade (TAVEIRA et al., 2007).

Souza Fernandes e colaboradores (2016) demonstraram a ação antimicrobiana de uma série de amino álcoois (Apêndice A) frente a bactérias Gram-positivas, onde observaram que o tamanho da cadeia alifática, ou seja, sua lipofilicidade pode ser considerado importante para sua atividade. Além disso, compostos da mesma série revelaram ação antitumoral.

Os amino álcoois podem ser observados ainda nos polienos, como representantes a anfotericina B e nistatina (Figura 17) que são agentes antifúngicos. É possível observar ainda a presença de amino álcool e diaminas na estrutura do etambutol, antimicrobiano amplamente empregado no tratamento da tuberculose (Figura 20) (RANG et al., 2007).

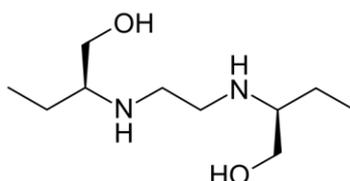


Figura 20: Fórmula estrutural do etambutol.  
Fonte: O autor (2018).

O grupo das diaminas (Apêndice A) também possuem inúmeras ações farmacológicas descritas como as *N*-monoalquiladas apresentam ação anti-*T. vaginalis* e *Giardia lamblia*, efetivas frente à *M. tuberculosis* e atividade leishmanicida (*L. amazonensis* e *L. chagasi*) (COIMBRA et al., 2010; GIORDANI et al., 2011; GIORDANI et al., 2009; REZENDE JR et al., 2009; SILVA et al., 2012).

Os compostos diaminas correspondem a um tipo de poliamina com dois grupos amino sendo utilizados como precursores de sínteses orgânicas diversas (YI et al., 2015). Sua ação biológica pode ser observada em inúmeros trabalhos (Apêndice A), como a ação antiviral *in vitro* de uma série de compostos diaminas frente à cultura de células infectadas com o vírus da hepatite C, inibidores de acetil-CoA-carboxilase (controle do metabolismo de lipídeos) em mamíferos, potencial inibitório sobre *Leishmania*, *T. vaginalis*, *T. cruzi* e *Shistosoma mansoni* (SOUZA FERNANDES et al., 2013; HWANG et al., 2013; KUNG et al., 2015; YAMANAKA et al., 2013).

A esses grupos químicos ainda é atribuída a ação antimicrobiana (Apêndice A) diante de bactérias Gram-positivas (*S. aureus* ATCC 29213 e *S. epidermidis* ATCC 12228), Gram-negativa (*P. aeruginosa* ATCC 27853) e *M. tuberculosis* (H37Rv ATCC 27294) (REZENDE JR et al., 2015). Sharma e colaboradores (2011) também evidenciaram a ação frente à *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *S. epidermidis*, além de relatar potencial antifúngico

contra *Geotrichum candidum* NCIM 980, *C.albicans* MTCC 3017 e *C. glabrata* MTCC 3019. Seu potencial se estende ao apresentar ação sobre o fungo fitopatogênico *Pyrenophora avenae* (BREAR; WALTERS; ROBINS, 1997).

Diante do exposto, é notória a diversidade de empregos e os resultados promissores na área biológica associados aos compostos contendo, em suas estruturas, unidades amino álcoois e diaminas. Todavia, a avaliação do potencial antifúngico destas classes orgânicas ainda é pouco explorada, o que atribui maior relevância ao presente trabalho.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Moléculas orgânicas

Por meio de colaboração estabelecida com o Laboratório de Química Orgânica do Instituto de Ciências Exatas na Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), foram sintetizadas 50 moléculas orgânicas com características químicas e físico-químicas distintas. Diante deste *rol* de substâncias, vislumbrou-se a possibilidade de avaliar o potencial antifúngico *in vitro* das mesmas frente aos principais fungos causadores das onicomicoses.

Todas as moléculas supracitadas (Tabela 1) foram obtidas por meio de parceria estabelecida com o referido Laboratório de Química Orgânica e submetidas à atividade antifúngica para selecionar as que apresentassem resultados mais promissores (Figura 21) e partir destas realizar as demais análises, a fim de averiguar seu potencial antifúngico e possível mecanismo de ação.

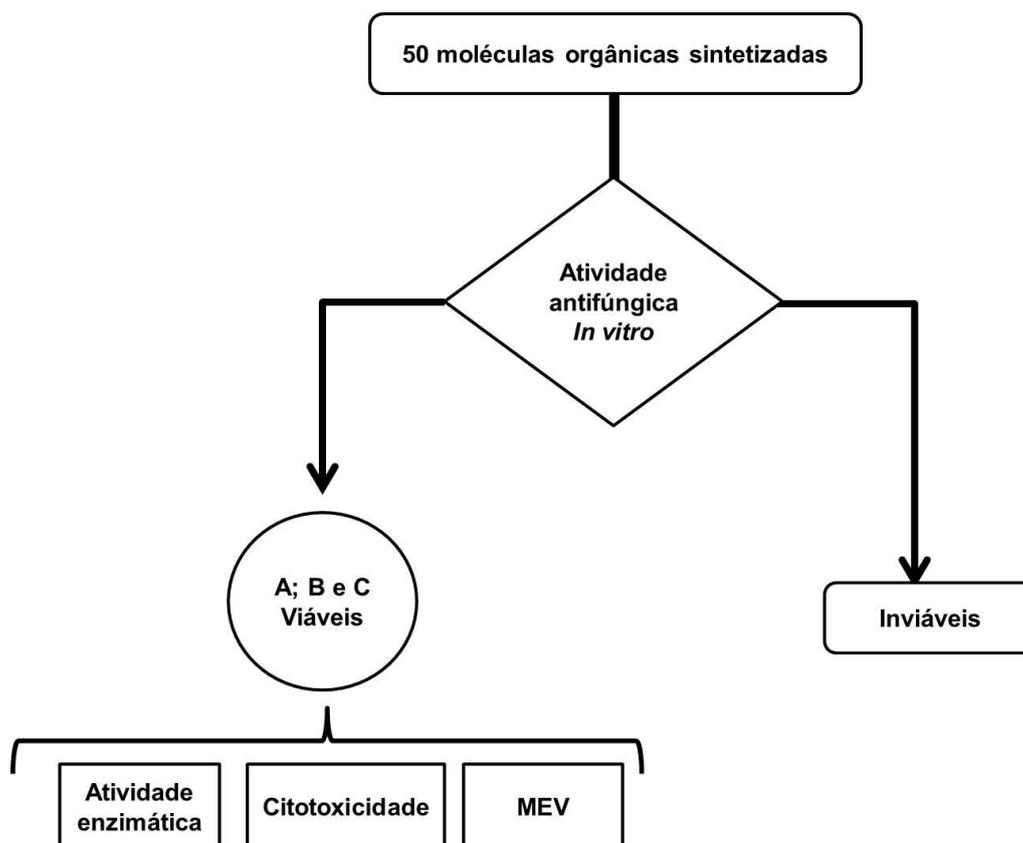


Figura 21: Fluxograma representativo do presente estudo.  
Fonte: O autor (2018).

Tabela 1: Identificação das moléculas submetidas à atividade antifúngica.

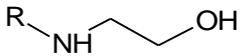
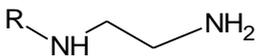
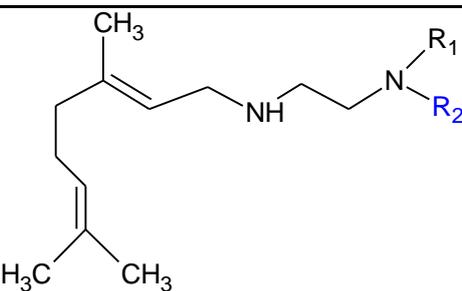
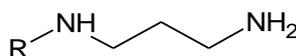
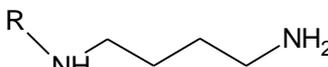
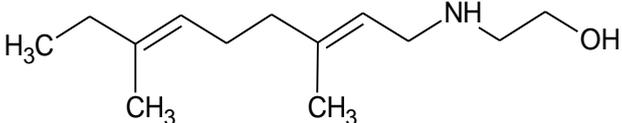
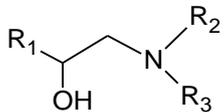
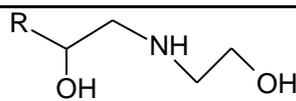
Fórmula Estrutural	Identificação/ Radical
	1 - R: (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub> 2 - R: (CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> CH <sub>3</sub> 3 - R: (CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> CH <sub>3</sub> 4 - R: (CH <sub>2</sub> ) <sub>13</sub> CH <sub>3</sub> 5 - R: (CH <sub>2</sub> ) <sub>15</sub> CH <sub>3</sub>
	6 - R: (CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> CH <sub>3</sub> 7 - R: (CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> CH <sub>3</sub> 8 - R: (CH <sub>2</sub> ) <sub>13</sub> CH <sub>3</sub>
	9 - R <sub>1</sub> : H; R <sub>2</sub> : H 10 - R <sub>1</sub> : CH <sub>3</sub> ; R <sub>2</sub> : CH <sub>3</sub>
	11 - R: (CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> CH <sub>3</sub> 12 - R: (CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> CH <sub>3</sub> 13 - R: (CH <sub>2</sub> ) <sub>13</sub> CH <sub>3</sub>
	14 - R: (CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> CH <sub>3</sub> 15 - R: (CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> CH <sub>3</sub> 16 - R: (CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> CH <sub>3</sub>
	17 -
	18 - R <sub>1</sub> : (CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> CH <sub>3</sub> R <sub>2</sub> e R <sub>3</sub> : (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH 19 - R <sub>1</sub> : (CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> CH <sub>3</sub> R <sub>2</sub> : H; e R <sub>3</sub> : (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NH <sub>2</sub> 20 - R <sub>1</sub> : (CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> CH <sub>3</sub> R <sub>2</sub> : H; e R <sub>3</sub> : (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NH <sub>2</sub>
	21 - R: (CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> CH <sub>3</sub>

Tabela 1: Identificação das moléculas submetidas à atividade antifúngica (continuação)

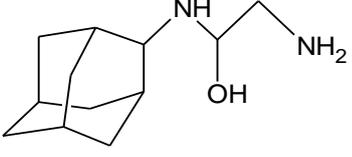
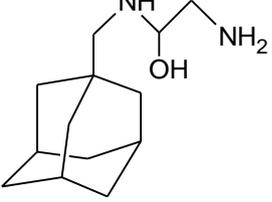
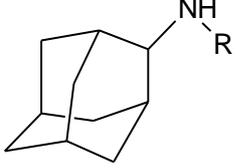
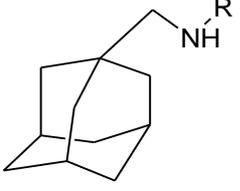
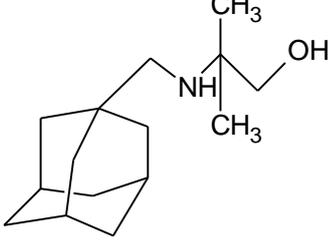
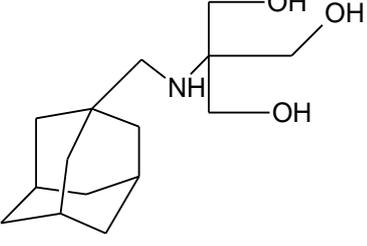
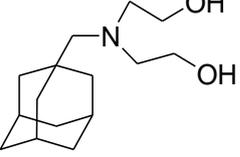
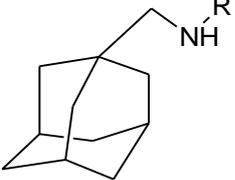
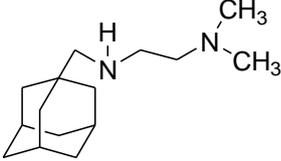
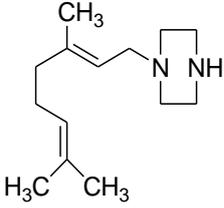
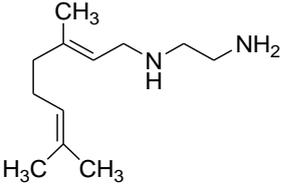
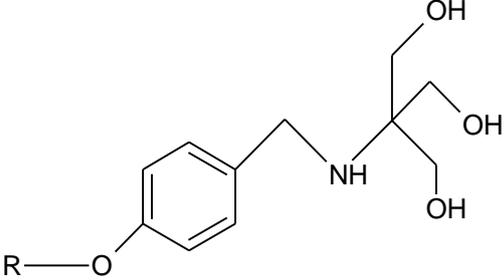
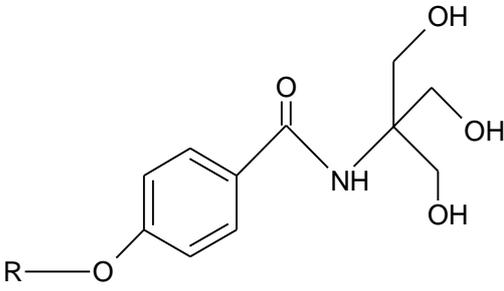
Fórmula Estrutural	Identificação/ Radical
	22-
	23 -
	24 - R: (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH 25 - R: (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> OH
	26 - R: (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH 27 - R: (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> OH
	28 -
	29 -
	30 -

Tabela 1: Identificação das moléculas submetidas à atividade antifúngica (continuação)

Fórmula Estrutural	Identificação/ Radical
	31 - R: $(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ 32 - R: $(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ 33 - R: $(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ 34 - R: $(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$
	35 -
	36 -
	37 -
	38 - R: $(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ 39 - R: $(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ 40 - R: $(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$ 41 - R: $(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$ 42 - R: $(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$ 43 - R: $(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$
	44 - R: $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ 45 - R: $(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ 46 - R: $(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ 47 - R: $(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$ 48 - R: $(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$ 49 - R: $(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$ 50 - R: $(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$

Fonte: O autor (2018).

## 4.2 Cepas fúngicas

Foram selecionadas três cepas de fungos filamentosos: *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11481 (Figura 22), *T. rubrum* CCT 5507 URM 1666 (Figura 23) e *Epidermophyton floccosum* CCF-IOF-3757 (Figura 24) e uma de fungo em fase leveduriforme: *Candida albicans* ATCC 10231 (Figura 25 A) fornecidas pela Fundação André Tosello e pelo Laboratório de Microorganismos de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz. Todas as cepas estão armazenadas no laboratório do Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde (NUPICS) na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Foi empregada ainda uma cepa fúngica de *C. albicans* isolada de paciente (Figura 25 B) no laboratório Maurílio Baldi do Hospital Universitário da UFJF e gentilmente cedidas para a realização deste estudo.

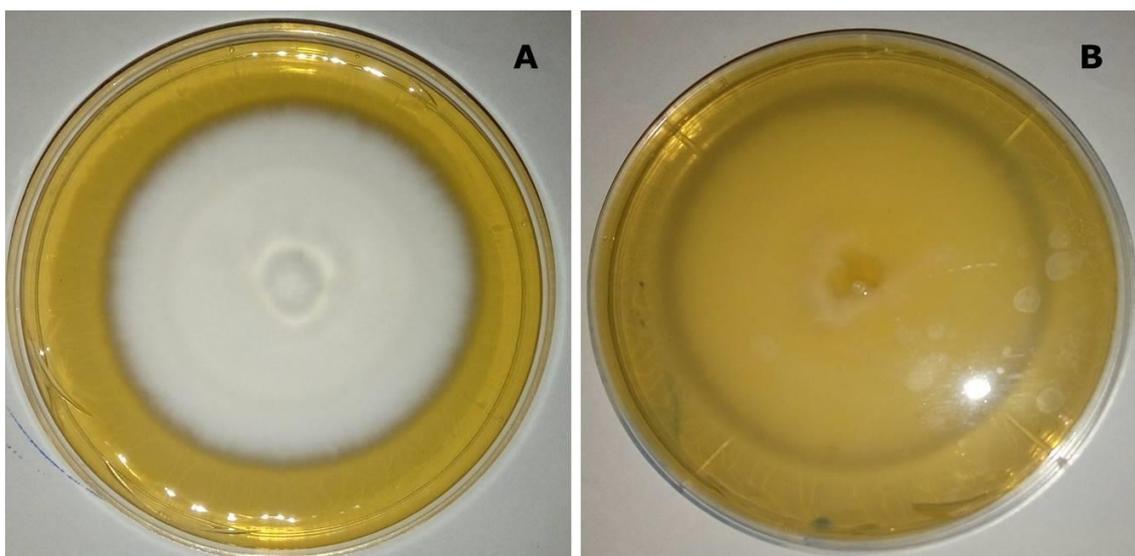


Figura 22: Morfologia macroscópica de *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11481.

Aspecto macroscópico da colônia fúngica: (A) anverso e (B) verso.

Fonte: O autor (2018).

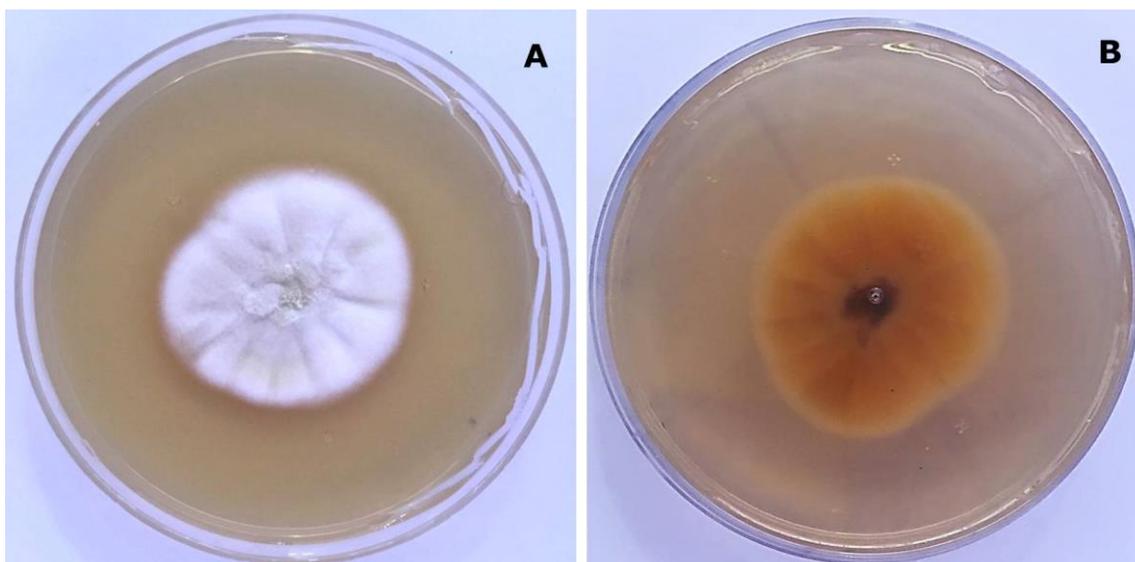


Figura 23: Morfologia macroscópica de *Trichophyton rubrum* CCT 5507 URM 1666.

Aspecto macroscópico da colônia fúngica: (A) anverso e (B) verso.

Fonte: O autor (2018).

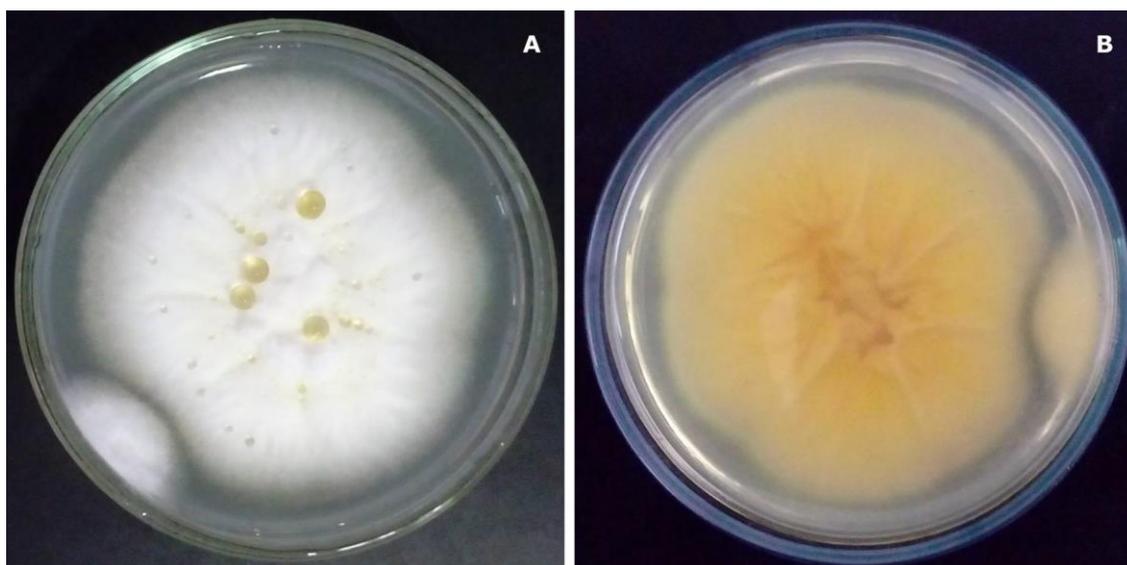


Figura 24: Morfologia macroscópica de *Epidermophyton floccosum* CCF-IOF-3757.

Aspecto macroscópico da colônia fúngica: (A) anverso e (B) verso.

Fonte: O autor (2018).

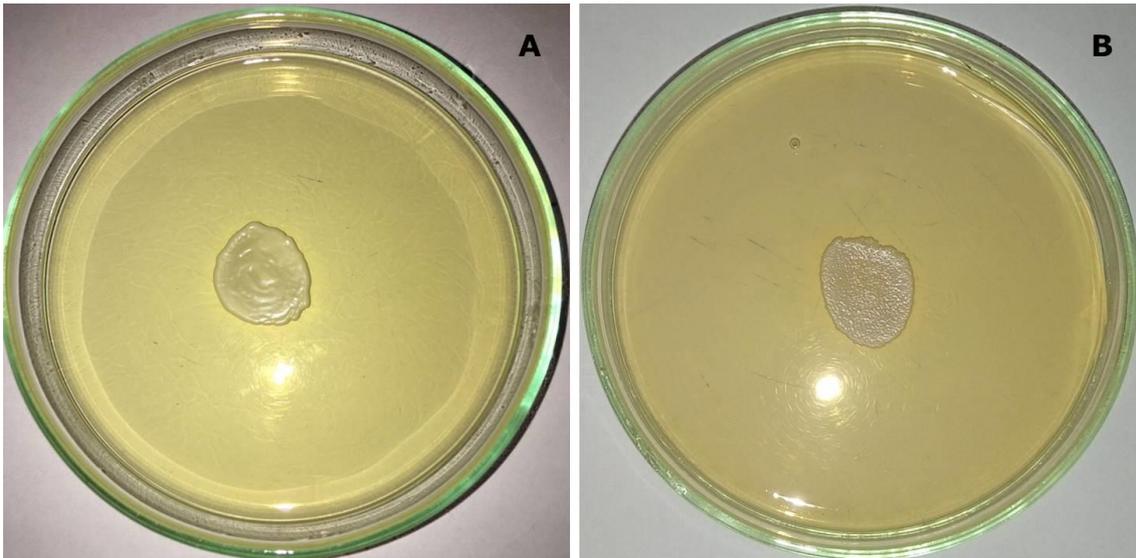


Figura 25: Morfologia macroscópica de *Candida albicans*.

A: *Candida albicans* ATCC 10231 e B: Isolado clínico de *Candida albicans*

Fonte: O autor (2018).

### 4.3 Realização do microcultivo

#### 4.3.1 Fungo filamentososo

O microcultivo corresponde a uma etapa de controle de qualidade que visa a análise morfológica, por microscopia óptica, das estruturas de reprodução, ornamentação e de todo o micélio aéreo de fungos filamentosos (PEREIRA, 2009). A técnica foi realizada de acordo com Pereira (2009), a qual pode ser identificada por meio do esquema apresentado abaixo (Figura 26).

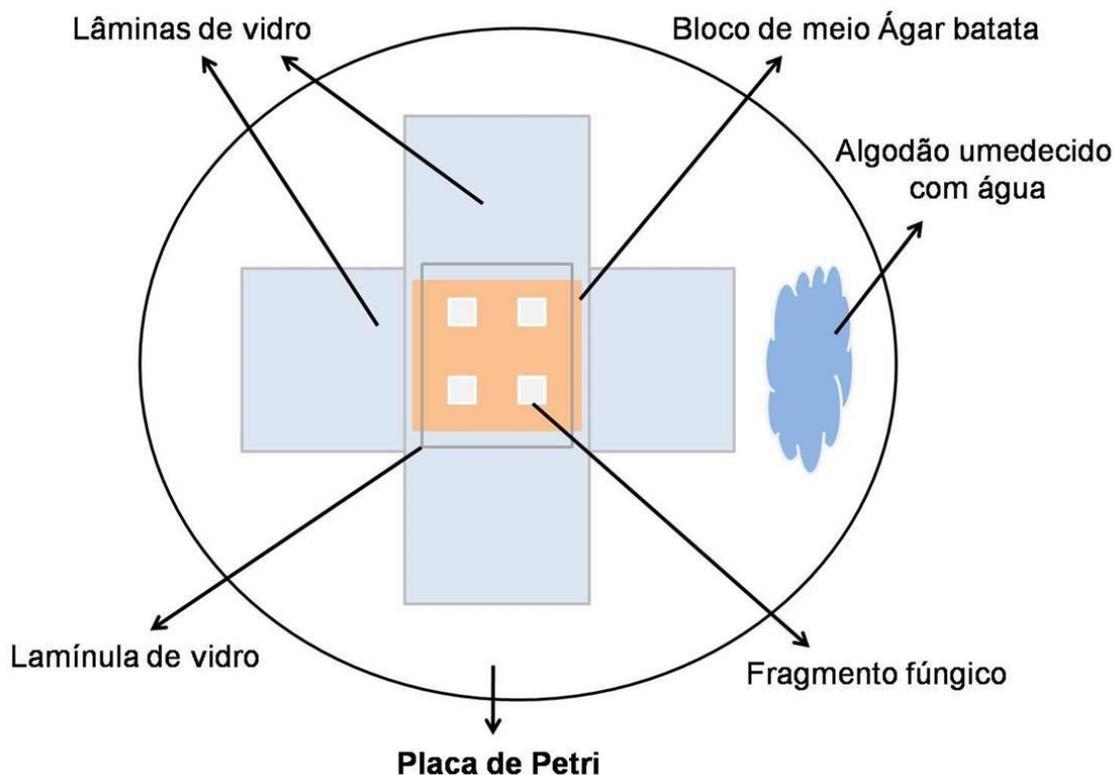


Figura 26: Esquema do microcultivo em lâmina de vidro.  
Fonte: Caneschi (2013).

A técnica foi realizada com o emprego de duas lâminas e uma lamínula de vidro, placa de Petri, um “bloco” de ágar batata dextrose de 1,0 cm<sup>2</sup> com 5 – 8 mm de altura. As lâminas foram colocadas uma sobre a outra e sobre elas adicionado um bloco de ágar. Em seguida foi realizada a semeadura do fungo, a partir de um repique recente, nos quatro pontos do bloco e recobertos com a lamínula. Posteriormente, foi adicionado um algodão estéril umedecido com água, também estéril, no interior da placa de Petri, a fim de formar uma atmosfera úmida. A placa de Petri foi fechada e incubada a  $28 \pm 2$  °C por 7 a 10 dias até o surgimento de hifas aderidas à lamínula (PEREIRA, 2009).

Após o período de crescimento fúngico, retirou-se a lamínula e à ela foi adicionada uma gota do corante lactofenol azul de algodão. Posteriormente, essa foi afixada em uma lâmina de vidro e observada ao microscópio óptico (Eclipse - E200, Nikon, Japão) com objetiva de 40 vezes, o que permitiu visualizar as estruturas de reprodução (micro e macroconídios), bem como hifas e estruturas de ornamentação (BRASIL, 2013).

Nas cepas de *T. mentagrophytes* ATCC 11481 (Figura 27) e *T. rubrum* CCT 5507 URM 1666 (Figura 28) foi evidenciada a presença de numerosos microconídios aderidos às hifas e macroconídios raros.

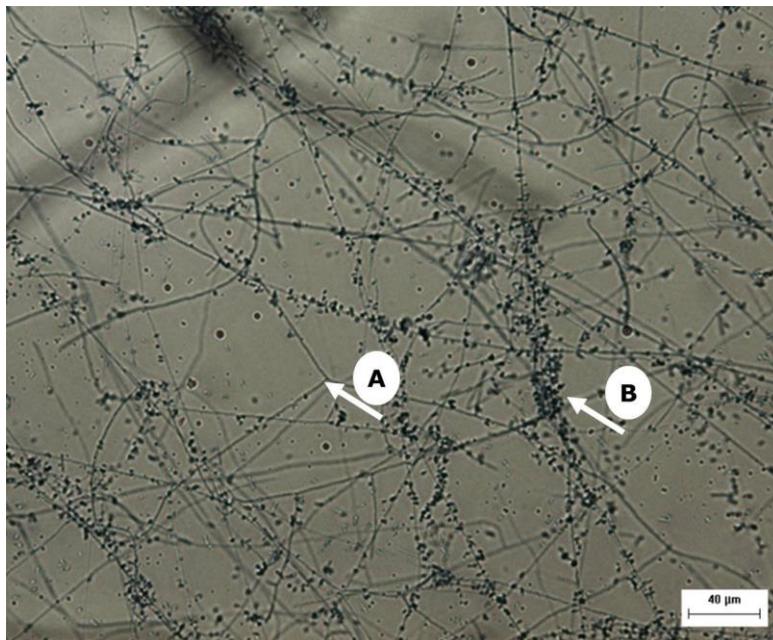


Figura 27: Imagem de microcultura de *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11481.

Seta: A – hifa e B - microconídios

Fonte: O autor (2018).

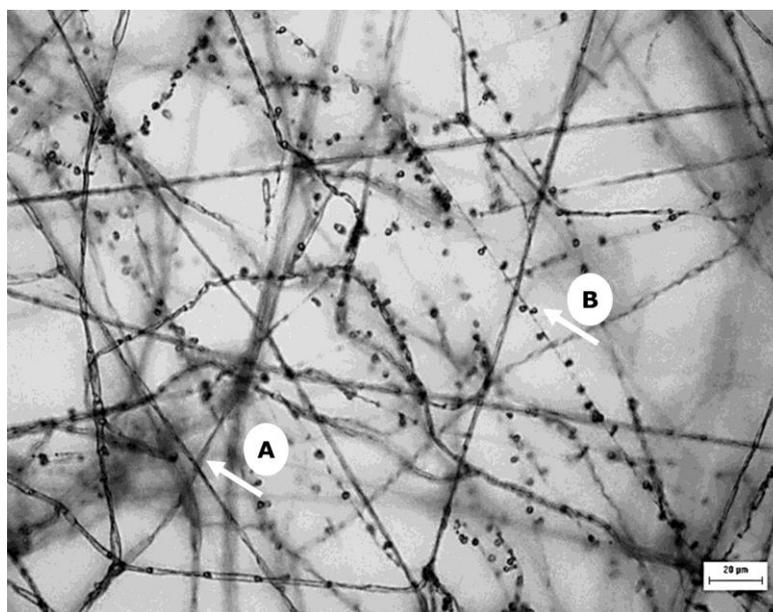


Figura 28: Imagem de microcultura de *Trichophyton rubrum* CCT 5507 URM 1666.

Seta: A – hifa e B - microconídios

Fonte: O autor (2018).

A cepa de *E. floccosum* CCF-IOF-3757 foi caracterizada microscopicamente pela presença de hifas cilíndricas, hialinas e septadas e pelo grande número de macroconídios (Figura 29).

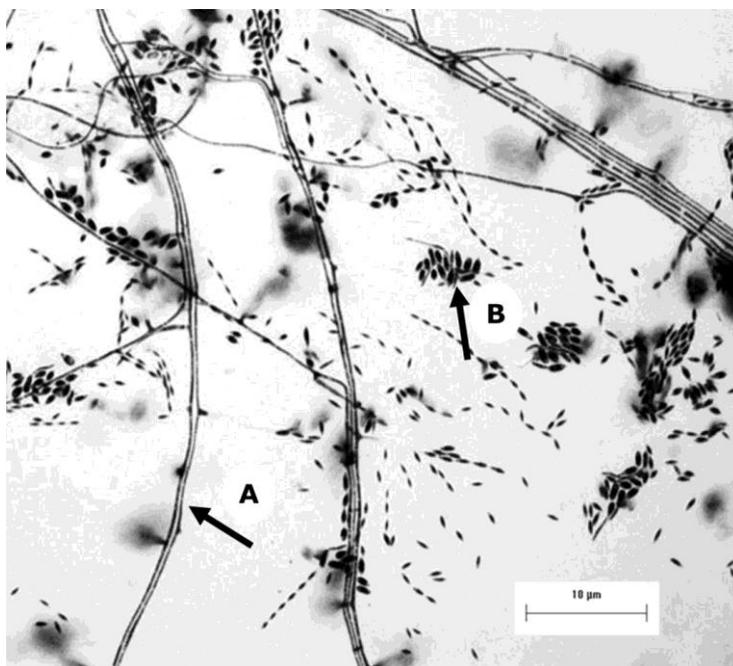


Figura 29: Imagens do microcultura de *Epidermophyton floccosum* CCF-IOC-3757.

Seta: A – hifa e B - macroconídios

Fonte: O autor (2018).

#### 4.3.2 Fungo leveduriforme

As cepas de *C. albicans* foram avaliadas com o auxílio de uma lâmina de vidro, salina 0,9 % (p/v) e corante lactofenol azul de algodão (Figura 30) para observação ao microscópio óptico (Eclipse - E200, Nikon, Japão) empregando a objetiva de 40 vezes de aumento.

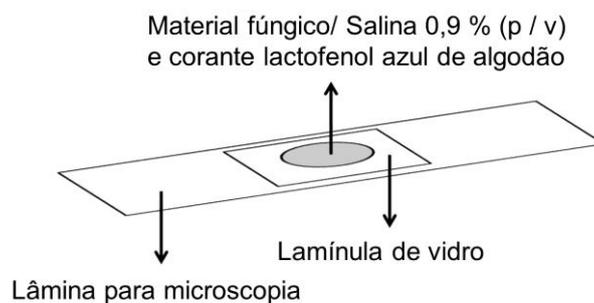


Figura 30: Esquema para avaliação de levedura por microscopia óptica.

Fonte: O autor (2018).

Ao averiguar as duas cepas de *C. albicans* foi observada a presença de células ovoides e em brotamento e ausência de hifas ou pseudo-hifas (Figura 31).

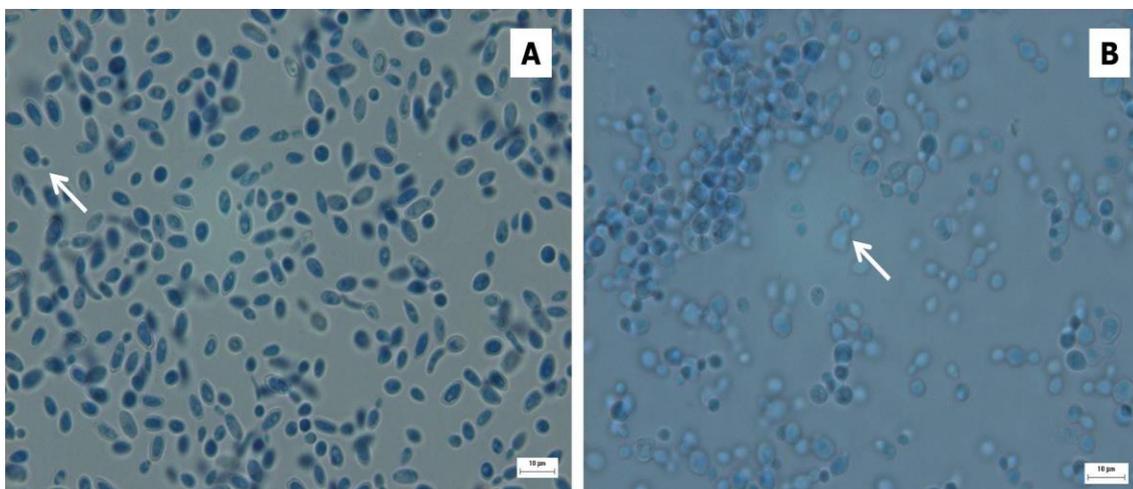


Figura 31: Imagens do microcultura de *Candida albicans*.

A: *C. albicans* ATCC 10231; B: *C. albicans* isolado clínico. Setas indicam células ovoides e em brotamento. Aumento de 40x.

Fonte: O autor (2018).

#### 4.4 Caracterização molecular

As respectivas cepas fúngica supracitadas no item 4.2 foram identificadas por meio da caracterização por metodologia molecular, de acordo com o protocolo descrito por Lindsley e colaboradores (2001). Todas as análises foram realizadas por meio de colaboração estabelecida com o Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ (Fiocruz/RJ).

O sequenciamento parcial da região ITS foi realizado utilizando os iniciadores ITS1(TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (LINDSLEY et al., 2001). Resumidamente, foram utilizados 100 ng de DNA, 10 pmol de cada *primer* na reação, e a temperatura de emparelhamento foi de 58 °C. O sequenciamento automatizado foi realizado com o emprego de uma Plataforma de Sequenciamento na Fundação Oswaldo Cruz - PDTIS/FIOCRUZ, Brasil. As sequências foram editadas usando o *software* Sequencher 4.9 e comparadas pelo *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*. As sequências obtidas para a região ITS dos

isolados de *T. mentagrophytes* ATCC 11481 e *C. albicans* ATCC 10231 já estão depositadas no *Genbank* sob os respectivos número de acesso NCBI/GenBank KX132909 e HQ199085.

A espécie *T. mentagrophytes* faz parte de um complexo, o que dificulta a sua identificação e caracterização apenas por meio de técnicas de microscopia óptica (DROUOT et al., 2009; OYEKA, 2000). Desta forma, o sequenciamento parcial da região ITS para o isolado *T. mentagrophytes* ATCC 11481 foi revisado, o qual demonstrou alta similaridade com o isolado de *T. mentagrophytes* (JX122271) depositado no *Genbank*. Já para a identificação em nível de espécie do isolado de *T. rubrum* CCT 5507 URM 1666 não foi necessário realizar o sequenciamento parcial de genes, uma vez que sua autenticidade já havia sido ratificada recentemente em outros estudos (BAPTISTA et al., 2015; BISHA; KIM; BREHM-STECHER, 2011; CANESCHI, et al., 2015; CANESCHI et al., 2017; RIVAS; MÜHLHAUSER, 2015). A cepa de *E. floccosum* CCF-IOF-3757 apresentou-se na forma pleomórfica, o que inviabilizou sua análise de espécie pela metodologia molecular descrita.

As leveduras do gênero *Candida* utilizadas no estudo foram avaliadas de acordo com a espécie por meio da realização do sequenciamento parcial da região ITS, sendo os mesmos confirmados como pertencentes a espécies *C. albicans*.

## 4.5 Atividade antifúngica

### 4.5.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da CIM para as referidas moléculas foi realizada de acordo com os protocolos M38-A2 (fungos filamentosos) e M27-A3 e M27-S4 (leveduras) do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012, 2008a e 2008b) com emprego de adaptações, conforme estabelecido por Almeida e colaboradores (2009). A CIM foi considerada a menor concentração de um agente antifúngico capaz de inibir o crescimento, visualmente detectado, do micro-organismo (CLSI, 2008a).

As análises foram realizadas em triplicata em placas de poliestireno estéreis de 96 poços (*Sarstedt*, Alemanha), empregando meio *Roswell Park*

*Memorial Institute* (RPMI) 1640 (*Sigma-Aldrich Chemistry*, EUA) tamponado com ácido 3(*N*-morfolino) propanossulfônico (MOPS) (JTBaker, Alemanha) (pH = 7,0 ± 0,2).

#### 4.5.1.1-Padronização do inóculo

##### 4.5.1.1.1 Fungo em fase filamentosa

O preparo da suspensão fúngica consistiu no emprego de 2 mL de solução salina estéril 0,9 % (p/v) e 20 µL de solução *Tween*-80/dimetilsulfóxido (DMSO) PA (1:1, v/v) para realização da lavagem de culturas de 7 - 15 dias de crescimento em SDA contendo 0,05 % (p/v) de cloranfenicol.

A suspensão de hifas e conídios formada foi transferida para um tubo cônico de 50 mL estéril e homogeneizado em vórtex (*Genie 2, Scientific Industries, EUA*) por 1 min. Após 5 min em repouso, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 50 mL estéril e a ele adicionado salina estéril 0,9 % (p/v) e homogeneizado, o que proporcionou a formação de uma suspensão (CLSI, 2008b).

Assim, o inóculo foi padronizado com o auxílio do espectrofotômetro (Libra S12, Biochrom, Reino Unido) e cubeta de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico e transmitância ajustada na faixa de 68 – 70 % em comprimento de onda fixo de 530 nm, o qual proporciona uma suspensão com  $0,4 \times 10^4$  a  $5 \times 10^4$  unidades formadoras de colônia (UFC)/mL (ALMEIDA et al., 2009).

Posteriormente, esta suspensão foi diluída na proporção de 1: 50 (v/v) em meio RPMI - 1640 tamponado com MOPS e empregada para a determinação da CIM, por meio da transferência de uma alíquota de 100 µL para a microplaca.

#### 4.5.1.1.2 Fase leveduriforme

A suspensão foi preparada por meio da adição de 2 mL de solução salina estéril 0,9 % (p/v) sobre culturas de 24 - 48 h de crescimento em SDA contendo 0,05 % (p/v) de cloranfenicol.

A mistura formada foi transferida para um tubo cônico de 50 mL estéril e homogeneizado em vórtex (*Genie 2, Scientific Industries, EUA*) por 1 min. Uma alíquota foi diluída com salina estéril 0,9 % (p/v) e analisada no mesmo espectrofotômetro supracitado tendo a transmitância ajustada na faixa de 89 % em comprimento de onda fixo de 530 nm (CLSI, 2008a; FALAHATI et al., 2014). Assim, houve a formação de uma suspensão com  $1 - 6 \times 10^6$  UFC/mL; essa por sua vez passou por duas diluições seguidas, 1: 50 (v/v) e 1: 20 (v/v) para obtenção final de  $1 - 5 \times 10^3$  UFC/mL em meio RPMI-1640 tamponado com MOPS. O inóculo preparado foi empregado para a determinação da CIM por meio da transferência de uma alíquota de 100  $\mu$ L para a microplaca.

#### 4.5.1.2-Diluição dos agentes antifúngicos

A avaliação da atividade antifúngica foi realizada por meio da solubilização das moléculas testadas e dos fármacos de referência: terbinafina (Gemini, Brasil), cetoconazol (Attivos Magistrais, Brasil), itraconazol (*Sigma-Aldrich Chemistry, EUA*), anfotericina B (*Sigma-Aldrich Chemistry, EUA*), amorolfina (*Sigma-Aldrich Chemistry, EUA*) e nistatina (*Sigma-Aldrich Chemistry, EUA*) de acordo com a Tabela 2 (ALMEIDA et al., 2009; CLSI, 2012, 2008a e 2008b).

Tabela 2: Forma de solubilização das amostras avaliadas.

Amostras	Agente solubilizante	Faixa de concentração avaliada
Terbinafina	DMSO: <i>Tween 80</i>	0,0234 a 480* <sup>F</sup>
Cetoconazol	DMSO: <i>Tween 80</i>	0,0313 a 640* <sup>F</sup>
Itraconazol	DMSO: <i>Tween 80</i>	0,0313 a 64* <sup>FL</sup>
Amorolfina	DMSO: <i>Tween 80</i>	0,0313 a 16* <sup>F</sup>
Anfotericina B	Água destilada	0,0313 a 16* <sup>L</sup>
Nistatina	DMSO: <i>Tween 80</i>	0,5 a 64** <sup>L</sup>
Moléculas testadas	DMSO: <i>Tween 80</i>	7,81 a 1.000* <sup>F</sup>
	DMSO: <i>Tween 80</i>	39 a 5.000* <sup>L</sup>

\*: µg/mL; \*\*: UI/mL; <sup>F</sup>: fungo filamentoso; <sup>L</sup>: fungo leveduriforme  
 Fonte: O autor (2018).

Os agentes antifúngicos foram solubilizados e submetidos a uma diluição seriada na respectiva faixa estabelecida (Tabela 2), perfazendo um total de doze diluições avaliadas. Para a realização das mesmas foi empregado meio RPMI-1640 (*Sigma-Aldrich Chemistry*, EUA) tamponado com MOPS (*Sigma-Aldrich Chemistry*, EUA).

#### 4.5.1.3-Preparo da microplaca

Placas estéreis de poliestireno, fundo chato e 96 poços (*Sarstedt*, Alemanha) foram utilizadas de modo a avaliar as moléculas selecionadas, fármacos de referência, os controles de viabilidade do micro-organismo e controle de esterilidade do meio de cultura, sendo essas análises realizadas em triplicata.

O procedimento consistiu na transferência de uma alíquota de 100 µL das respectivas diluições dos agentes antifúngicos avaliados para os poços da microplaca, seguida pela adição de 100 µL de meio RPMI – 1640 tamponado com MOPS contendo o inóculo padronizado, como descrito no item 4.5.1.1.1 (fungo filamentoso) ou 4.5.1.1.2 (fungo leveduriforme) (ALMEIDA et al., 2009; CLSI, 2012, 2008a e 2008b).

O teste de viabilidade fúngica foi preparado pela adição de 100 µL de RPMI – 1640 tamponado com MOPS e 100 µL desse mesmo meio de cultura contendo o inóculo à microplaca.

Após estes procedimentos, a microplaca foi homogeneizada em agitador de microplacas (SI-0400, *Genie Scientific*, EUA) durante 2 min e incubada a  $28 \pm 2$  °C por 7 dias (fungos filamentosos) e  $37 \pm 2$  °C por 48 h (leveduras).

#### 4.5.2 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

A CFM corresponde à menor concentração da substância antifúngica analisada, na qual a cepa fúngica não foi capaz de apresentar, visualmente, crescimento quando inoculada em meio de cultura microbiológica sem a presença de antifúngicos (PEREIRA, 2009).

##### 4.5.2.1-Fase filamentosa

Após a leitura da CIM, foi determinada a CFM (MAGAGNIN et al., 2011). Para tal, alíquotas de 10 µL do meio de cultura microbiológica presente nos poços onde não foi observado, visualmente, crescimento fúngico foram transferidas para microplacas de 96 poços contendo 200 µL de caldo *Sabouraud* dextrose (SDB) desprovidas de qualquer antifúngico.

##### 4.5.2.2-Fase leveduriforme

Uma alíquota de 5 µL do meio de cultura microbiológica presente nos poços onde não observamos, visualmente, crescimento fúngico foram transferidas para criotubos contendo 1,0 mL SDB sem a presença de antifúngicos.

Após estes procedimentos, a microplaca foi homogeneizada em agitador de microplacas durante 2 min e incubada a  $28 \pm 2$  °C por 7 dias (fungos filamentosos) e os criotubos homogeneizados em vórtex e incubados a  $37 \pm 2$  °C por 48 h (leveduras).

O agente antifúngico foi caracterizado como fungistático caso ocorresse crescimento fúngico após a sua diluição e, fungicida na ausência de crescimento (ESPINEL-INGROFF et al., 2002).

## 4.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A realização de MEV ocorreu com o preparo das seguintes amostras: suspensão fúngica não submetida ao tratamento e suspensão fúngica submetida ao tratamento com os fármacos de referência (terbinafina, cetoconazol, itraconazol amorolfina, anfotericina B e nistatina) e moléculas testadas na respectiva CIM estabelecidas no item 4.5.1.

### 4.6.1 Fase filamentosa

A suspensão fúngica foi preparada por meio do emprego dos respectivos fungos citados no item 4.2 com 7 dias de crescimento em SDA e salina 0,9 % (p/v) estéril. Essa foi padronizada em espectrofotômetro na faixa de 68 – 70 % de transmitância em comprimento de onda fixo de 530 nm. Posteriormente essa suspensão foi diluída na proporção de 1: 50 (v/v) em meio RPMI - 1640 tamponado com MOPS.

### 4.6.2 Fungo leveduriforme

A partir da cepa de *C. albicans* ATCC 10231 com 48 h de crescimento em SDA foi preparada a suspensão fúngica com o emprego de salina estéril 0,9 % (p/v). O número de células, nela contida, foi ajustado em espectrofotômetro na faixa de 89 – 90 % de transmitância em comprimento de onda fixo de 530 nm. Posteriormente, essa suspensão foi diluída na proporção de 1 : 50 (v/v) e 1 : 20 (v/v) em meio RPMI - 1640 tamponado com MOPS.

### 4.6.3 Diluição dos agentes antifúngicos

Os fármacos de referência (terbinafina, cetoconazol, itraconazol, amorolfina, anfotericina B e nistatina) e as moléculas testadas foram solubilizadas como descrito no item 4.5.1.2 para o preparo das soluções com as respectivos valores de CIM para cada cepa avaliada.

#### 4.6.4 Preparo da microplaca

Foram empregadas microplacas estéreis de polipropileno, fundo chato e 24 poços (*Sarstedt*, Alemanha). Em cada poço foi adicionado uma alíquota de 500  $\mu$ L das respectivas diluições dos agentes antifúngicos avaliados, seguida pela adição de 500  $\mu$ L de meio RPMI – 1640 tamponado com MOPS e com o inóculo padronizado nos itens 4.5.1.1.1 e 4.5.1.1.2 para os fungos filamentosos e leveduras, respectivamente.

Após estes procedimentos, a microplaca foi homogeneizada em agitador de microplacas (SI-0400, *Genie Scientific*, Estados Unidos), durante 2 min e incubada a  $28 \pm 2$  °C por 7 dias (fungos filamentosos) e  $37 \pm 2$  °C por 48 h (leveduras).

#### 4.6.5 Preparo para fungos filamentosos

Decorrido o tempo de incubação ( $28 \pm 2$  °C/ 7 dias), o volume de cada amostra foi centrifugado a 1.301 *g*/ 10 min à temperatura ambiente (Eppendorf, 5417R, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e as células residuais submetidas a 3 ciclos de lavagens com tampão fosfato 0,1 M (pH = 7,2) e centrifugação nesta mesma configuração.

Posteriormente, as amostras foram submetidas às seguintes etapas de acordo com Caneschi e colaboradores (2015), Martinelli; Santos (2010) e Mio; Novaes; Alves (2006):

a. Fixação: foram adicionados 300  $\mu$ L da solução 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) à amostra previamente lavada e deixou-se em contato por 24 h sob refrigeração (4 °C). Posteriormente, as células fúngicas foram submetidas a 2 ciclos de lavagem com tampão fosfato (pH = 7,2) e centrifugadas a 1.301 *g*/ 10 min à temperatura ambiente;

b. Adesão à lamínula: todo o sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi aderido à lamínula de vidro circular (13 mm) previamente recoberta com solução de poli-d-lisina 0,1 % (p/v) (*Sigma-Aldrich Chemistry*, EUA);

c. Pós-fixação: adicionou-se às células aderidas à lamínula solução de tetróxido de ósmio 1 % (*Sigma-Aldrich Chemistry*, EUA) por 30 min e em seguida lavou-se com tampão cacodilato (pH = 7,2);

d. Desidratação: realizou-se lavagens com etanol PA em concentrações crescentes (7,5; 15; 30; 50; 70; 90 e 100 %) por 15 min cada;

e. Ponto crítico: as amostras foram submetidas à desidratação em ponto crítico (Leica EM CPD 030, Alemanha);

f. Fixação em *stubs*: as lamínulas foram fixadas em *stubs* de alumínio com auxílio de fita de carbono dupla face;

g. Metalização: os *stubs* receberam banho de vapor de ouro em metalizador (Balzer FL-9496, Liechtenstein);

h. MEV: as amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL, JSM 6390LV) sob voltagem de 15 Kv e distância de trabalho de 17 mm.

As etapas de ponto crítico, metalização e MEV foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

#### 4.6.6 Preparo para leveduras

Após o período de incubação ( $37 \pm 2$  °C por 48 h), o volume de cada amostra foi centrifugado a 1.301 *g*/ 10 min (Eppendorf, 5417R, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e as células residuais submetidas a 3 ciclos de lavagens com tampão fosfato 0,1 M (pH = 7,2) e centrifugação nesta mesma especificação.

Posteriormente, as amostras foram submetidas às seguintes etapas:

a. Fixação: adicionaram-se 300  $\mu$ L da solução glutaraldeído 2,5 % (*Sigma-Aldrich Chemistry*, EUA) por 12 h. Posteriormente as células fúngica foram submetidas a 2 ciclos de lavagem com tampão fosfato (pH = 7,2) e centrifugadas a 1.301 *g*/ 10 min à temperatura ambiente;

b. Adesão à lamínula: todo o sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi aderido à lamínula de vidro circular (13 mm) previamente recoberta com solução de poli-d-lisina 0,1 % (p/v) (*Sigma-Aldrich Chemistry*, EUA);

c. Desidratação: realizou-se lavagens com etanol PA em concentrações crescentes (50, 70, 90 e 100 %) por 15 min cada;

d. Fixação em *stubs*: as lamínulas foram fixadas em *stubs* de alumínio, com auxílio de fita de carbono dupla face;

e. Metalização: os *stubs* receberam banho de vapor de ouro em metalizador (Balzer FL-9496, Liechtenstein);

f. MEV: as amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM 6390LV) sob voltagem de 15 Kv e distância de trabalho de 17 mm.

As etapas de metalização e microscopia foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

## 4.7 Fatores de virulência

### 4.7.1 Determinação da atividade de fosfolipase

A produção de fosfolipase foi avaliada de acordo com Mahmoudabadi, Zarrin; Miry (2010) e Ramos e colaboradores (2015) para os fungos filamentosos e leveduras. Respectivamente, utilizou-se no mesmo ensaio uma placa de Petri com SDA contendo cloreto de sódio (NaCl) 1 M, carbonato de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 5 M e 10 % de gema de ovo (IBRAHIM, et al., 1995). Após solidificação do meio foi adicionado no centro da placa uma alíquota da suspensão fúngica contendo aproximadamente  $10^6$  células/mL. Posteriormente, as placas de Petri foram incubadas por 7 dias a 28 °C (fungos filamentosos) e a 37 °C (leveduras).

Posteriormente, foi avaliada a ação das moléculas orgânicas selecionadas sobre a produção de fosfolipase em cada cepa fúngica, produtora de fosfolipase, de acordo com o seu respectivo valor de CIM estabelecido no item 4.5.1.

A formação de halo ao redor da colônia representa a hidrólise de fosfolipídios por ação da enzima secretada. O diâmetro da colônia (a) e o diâmetro da colônia mais o halo formado (b) foi medido com o auxílio de uma régua (Figura 32).

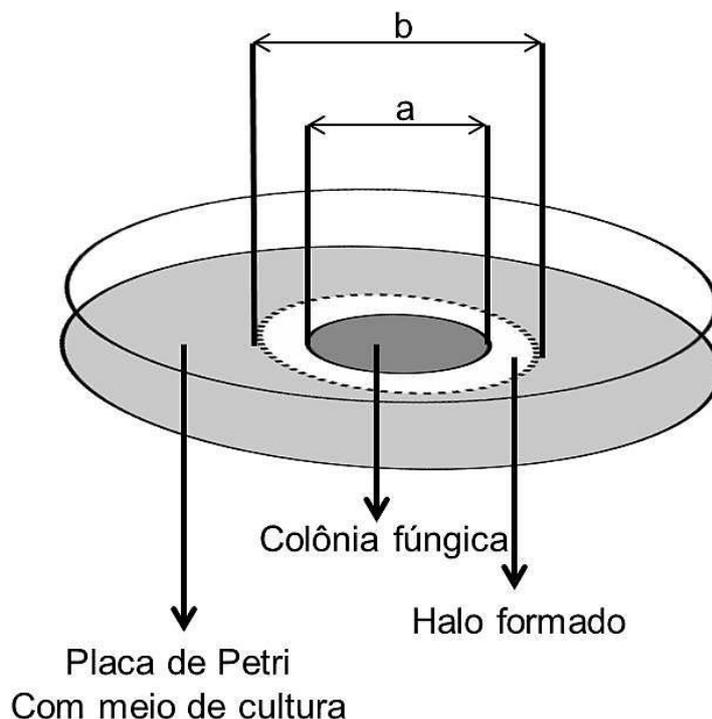


Figura 32: Esquema para avaliação da produção de fosfolipase.  
a: diâmetro da colônia; b: diâmetro da colônia mais o halo formado.  
Fonte: O autor (2018).

A atividade enzimática foi expressa em função do valor de Pz ( $a / b$ ) (Figura 32) (PEREIRA et al., 2011) e classificada em categorias (Tabela 3).

Tabela 3: Perfil de classificação dos resultados da atividade enzimática

Valor de Pz	Classificação da atividade enzimática
1,0	Ausência
0,64 – 0,999	Moderada
0 – 0,64	Forte

Pz: razão empregada para cálculo da atividade de fosfolipase.  
Fonte: Adaptada de Pereira e colaboradores (2011).

#### 4.7.2 Determinação da produção de melanina

A análise qualitativa da produção de melanina por fungos filamentosos e leveduriformes foi realizada de acordo com Almeida-Paes e colaboradores (2012) por meio de colaboração estabelecida com o Laboratório de Micologia no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz/RJ.

A produção de partículas de melanina pode ser observada a partir de culturas do fungo crescidas em 50 mL de SDB incubadas sob agitação a  $28 \pm 2$  °C por 7 dias (fungo filamentoso) e  $37 \pm 2$  °C por 48 h (levedura).

Os micro-organismos crescidos em meio de cultura passaram pelas seguintes etapas:

I. Centrifugou-se a 428 g por 10 min à temperatura ambiente. O *pellet* formado passou por sucessivas lavagens com solução de sorbitol 1,0 M/citrato de sódio 0,1 M (pH = 5,5), seguidas por centrifugação.

II. As células foram ressuspendidas em tampão fosfato (PBS) (pH = 7,2) e adicionou-se 10 mg/mL de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich *Chemistry*) e incubou-se a 30 °C por uma hora.

III. Realizaram-se sucessivas lavagens com tampão PBS e centrifugou-se a 428 g durante 10 min à temperatura ambiente até que o sobrenadante ficasse límpido.

IV. Adicionou-se tiocianato de guanidina (Sigma-Aldrich *Chemistry*) 4M às células e incubou-se sob agitação por 30 min.

V. Centrifugou-se (428 g/10 min à temperatura ambiente), eliminou-se o sobrenadante e adicionou-se tampão PBS. Repetiu-se o processo por 3 vezes.

VI. O *pellet* formado foi ressuspendido em ácido clorídrico (HCl) 6 M e aqueceu-se até ebulição por 1 h.

VII. Centrifugou-se (428 g/10 min à temperatura ambiente), eliminou-se o sobrenadante e adicionou-se tampão PBS. Repetiu-se o processo por 3 vezes.

O *pellet* final foi submetido a uma avaliação qualitativa visual para a identificação da presença ou não de partículas de melanina. Posteriormente, foram incubados a  $37 \pm 2$  °C por 48 h.

#### **4.8 Avaliação da citotoxicidade**

O teste de citotoxicidade foi realizado de acordo com Mosmann (1983), no qual foram empregados fibroblastos murinos (L929) e queratinócitos humanos (HaCaT) cultivados em meio de cultura *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* (ácido *N*-2-hidroxietilpiperazina-*N*-2-etanossulfônico) 10 mM, pH = 7,4 e mantidos a  $37 \pm 2$  °C em estufa a 5 % de CO<sub>2</sub>.

As células, fibroblastos e queratinócitos, foram semeadas em placas estéreis de polipropileno, fundo chato e 96 poços (*Sarstedt*, Alemanha) na densidade de  $5 \times 10^4$  células por poço e incubadas por 48 h a  $37 \pm 2$  °C em estufa a 5 % de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, o meio de cultura foi removido da placa e adicionado as amostras (cetoconazol, terbinafina, itraconazol, nistatina, amorolfina, anfotericina B e moléculas orgânicas selecionadas). Foram preparados os controles contendo o diluente DMSO na concentração máxima utilizada para o respectivo composto. As placas foram incubadas a  $37 \pm 2$  °C em estufa a 5 % de CO<sub>2</sub> por 48 h.

Decorrido o período de incubação, as amostras supracitadas foram removidas e adicionados 100 µL de DMEM com 10 % da solução de brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) (5 mg/mL) por poço. Em seguida, a placa foi reincubada por 3 h a  $37 \pm 2$  °C. Por último aspirou-se todo o sobrenadante e foi adicionado 100 µL de DMSO para solubilização dos cristais de formazam formados. A placa foi agitada por 2 min e em seguida submetida ao leitor de microplacas de 96 poços (*Thermo Scientific Multiskan Go*, Finlândia) para leitura de absorvância em comprimento de onda fixo de 540 nm.

A taxa de viabilidade celular foi estimada pela seguinte equação:

$$\% \text{ viabilidade celular} = a/b \times 100 \quad (\text{Eq. 01})$$

a: absorvância das células submetidas ao tratamento; b: absorvância das células não submetidas ao tratamento

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, seguida por teste *post hoc* de Bonferroni, com o emprego do *software Graphpad Prism* versão 6. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Atividade antifúngica

Todas as moléculas orgânicas disponibilizadas para análises foram avaliadas diante de uma ou mais cepas fúngicas para assim averiguar seu potencial farmacológico (Tabela 4). Foi possível evidenciar considerável ação antifúngica dos amino álcoois “1 – 5” e das diaminas “6 – 16” diante de cepas dos fungos filamentosos e leveduras avaliadas. Para as demais moléculas avaliadas (“17 – 50”) não foi observado resultados de CIM promissores.

Com os resultados das diaminas “6 - 16”, “36” e “37” (Tabela 4), nota-se seu potencial antifúngico com destaque para “7” e “8” pelos seus reduzidos valores de CIM. A presença do menor espaçador (2C) entre as amins aliada à cadeia alifática lateral com 12 e 13 carbonos, respectivamente, podem ser os responsáveis pelo bom desempenho. Resultado que vai ao encontro do trabalho de Sharma e colaboradores (2011) que encontraram ação fungicida de diaminas frente a leveduras, no entanto, suas moléculas avaliadas não apresentavam cadeia alifática como essas.

Ao estabelecer uma comparação entre os valores de CIM dos amino álcoois e diaminas é possível observar que essas apresentaram melhor ação antifúngica. Tal resultado pode ser ratificado pela análise de “3” e “7” e “4” e “8”, estas apresentam espaçador e cadeia lateral semelhantes, diferindo apenas em relação à função orgânica.

A série de moléculas “17 – 21” correspondiam a amino álcoois e diaminas, no entanto, não apresentou massa suficiente para a realização das análises antifúngica, o que inviabilizou a realização de avaliação mais específica do seu potencial frente às cepas avaliadas.

Por meio dos dados apresentados, é possível sugerir realização de associações entre diferentes moléculas (amino álcoois e amino álcoois; amino álcoois e diaminas ou diaminas e diaminas) que permite ampliar o espectro de ação, a fim de obter melhor ação antifúngica.

As moléculas que possuíam o grupo adamantano (“22 – 35”) apresentaram elevados valores de CIM diante dos fungos avaliados (Tabela 4),

fato que pode estar associado à reduzida solubilidade que possui no meio de cultura empregado (RPMI 1640).

Em publicação recente, Caneschi e colaboradores (2017) descreveram a ação antifúngica das estruturas “**38 – 50**” e observa seu reduzido potencial farmacológico para o tratamento de infecções fúngica, dentre as quais os amino álcoois apresentaram os menores valores de CIM e CFM frente a *T. mentagrophytes* ATCC 11481, *T. rubrum* CCT 5507 URM 1666 e *C. albicans* ATCC 10231.

Ao realizar uma análise conjunta de todas as moléculas avaliadas, os menores valores de CIM foram proporcionados pela diaminas “**7**”, “**8**” e “**16**”, no entanto, estas apresentaram reduzida hidrossolubilidade e massa para a realização das análises que compunham os objetivos deste trabalho.

Tabela 4: Concentração inibitória mínima das moléculas frente aos principais fungos causadores de onicomicoses.

ID	<i>T. mentagrophytes</i> ATCC 11481	<i>T. rubrum</i> CCT 5507 URM 1666	<i>E. floccosum</i> CCF-IOC-3757	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. albicans</i> Clínica
1	500	250	1.000	1.250	312,50
2	1,85	125	500	78	39
3	0,46	7,81	500	19	4,80
4	0,48	0,97	NA	0,60	2,40
5	250	15,62	3,9	4,80	4,80
6	3,90	3,90	15,62	9,70	9,70
7	0,24	0,12	1,95	4,80	4,80
8	0,97	0,48	1,95	1,20	2,40
9	62,50	NA	31,25	NA	NA
10	125	NA	500	NA	NA
11	500	125	125	19	19
12	1,95	31,25	3,90	19	19
13	3,90	0,97	NA	2,40	2,40
14	3,90	62,5	125	78	78
15	31,25	125	31,25	39	19
16	1,95	15,62	3,90	9	0,60

ID: Identificação genérica das moléculas de acordo com a Tabela 1. NA: Não analisada, devido à pequena quantidade de massa disponibilizada; resultados expressos em µg/mL.

Fonte: O autor (2018).

Tabela 4: Concentração inibitória mínima das moléculas frente aos principais fungos causadores de onicomicoses. (*continuação*)

ID	<i>T. mentagrophytes</i> ATCC 11481	<i>T. rubrum</i> CCT 5507 URM 1666	<i>E. floccosum</i> CCF-IOC-3757	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. albicans</i> Clínica
17	125	125	NA	NA	NA
18	250	NA	>1.000	NA	NA
19	NA	31,50	NA	19	NA
20	NA	15,60	NA	4,80	NA
21	NA	7,81	NA	39	NA
22	>1.000	NA	>1.000	NA	NA
23	500	NA	1.000	NA	NA
24 – 25	>1.000	NA	>1.000	NA	NA
26 – 28	1.000	NA	>1.000	NA	NA
29	>1.000	NA	>1.000	NA	NA
30	1.000	NA	>1.000	NA	NA
31	1.000	NA	1.000	NA	NA
32	250	NA	62,50	NA	NA
33	62,50	NA	125	NA	NA
34	31,25	NA	62,50	NA	NA
35	1.000	NA	1.000	NA	NA

ID: Identificação genérica das moléculas de acordo com a Tabela 1. NA: Não analisada, devido à pequena quantidade de massa disponibilizada; resultados expressos em µg/mL.

Fonte: O autor (2018).

Tabela 4: Concentração inibitória mínima das moléculas frente aos principais fungos causadores de onicomicoses.(*continuação*)

	<i>T. mentagrophytes</i> ATCC 11481	<i>T. rubrum</i> CCT 5507 URM 1666	<i>E. floccosum</i> CCF-IOC-3757	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. albicans</i> Clínica
36	31,25	NA	1.000	NA	NA
37	15,62	NA	125	NA	NA
38	125	62,50	NA	>5.000	NA
39	15,62	62,50	NA	78	NA
40	15,62	7,80	NA	31,25	NA
41	31,25	31,25	NA	62,50	NA
42	7,80	15,62	NA	15,62	NA
43	62,50	>1.000	NA	500	NA
44 - 45	>1.000	>1.000	NA	>5.000	NA
46	>1.000	>1.000	NA	625	NA
47 - 49	>1.000	>1.000	NA	>5.000	NA
50	125	>1.000	NA	1.250	NA

ID: Identificação genérica das moléculas de acordo com a Tabela 1. NA: Não analisada devido à pequena quantidade de massa disponibilizada; resultados expressos em µg/mL.

Fonte: O autor (2018)

Diante do exposto, foram selecionadas três moléculas de uma série orgânica de diaminas e amino álcoois anfílicos que apresentassem fácil solubilidade em meio aquoso, disponibilidade de massa e semelhança estrutural entre as mesmas para a continuidade dos estudos (Tabela 5).

Tabela 5: Estruturas químicas das moléculas selecionadas

ID	Fórmulas		Massa molar (g/mol)
	Estrutural	Molecular	
1		C <sub>10</sub> H <sub>23</sub> NO	173
2		C <sub>12</sub> H <sub>27</sub> NO	201
3		C <sub>14</sub> H <sub>31</sub> NO	229

ID: Identificação genérica das moléculas de acordo com a Tabela 1.  
Fonte: O autor (2018).

O potencial antifúngico das moléculas “1”, “2”, “3” e dos fármacos de referência foi avaliado frente aos principais fungos causadores de onicomicoses (Tabela 6).

Todas as três moléculas avaliadas apresentaram ação antifúngica frente aos fungos filamentosos e leveduras; entretanto, a molécula “3” foi a que apresentou melhor desempenho. Tal resultado permite atribuir nova atividade farmacológica, uma vez que substâncias pertencentes a essa classe de amino álcoois já demonstrou ação frente ao gênero *Leishmania*, *T. vaginalis*, *M. tuberculosis* e sobre as formas tripomastigotas do *T. cruzi* (SOUZA FERNANDES et al., 2016; SALES JR et al., 2014).

Tabela 6: Suscetibilidade *in vitro* dos principais fungos causadores de onicomicoses frente às moléculas orgânicas e aos fármacos de referência.

Substâncias	Cepa fúngica				
	<i>T. mentagrophytes</i> ATCC 11481	<i>T. rubrum</i> CCT 5507 URM 1666	<i>E. floccosum</i> CCF-IOC-3757	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. albicans</i> clínica
Moléculas	CIM/ CFM	CIM/ CFM	CIM/ CFM	CIM/ CFM	CIM/ CFM
1	500/1.000	250/500	1.000/1.000	1.250/2.500	312,50/625
2	1,85/7,81	125/250	500/1.000	78/78	39/78
3	0,46/7,81	7,81/7,81	500/1.000	19/19	4,80/19
Fármacos					
Cetoconazol	0,25/0,25	1/4	>640	-	-
Amorolfina	2/4	0,50/1	>16	-	-
Terbinafina	0,03/0,03	0,19/0,19	>480	-	-
Itraconazol	8/64	2/64	>64	>64	>64
Anfotericina B	-	-	-	125/500	78/312,50
Nistatina	-	-	-	0,33/3,33	0,08/0,80

CIM: concentração inibitória mínima; CFM: concentração fungicida mínima; resultados expressos em µg/mL.

Fonte: O autor (2018).

A molécula “1” apresentou os maiores valores de CFM para as cepas avaliadas, porém, foi fungicida diante dos fungos que se comportaram como resistentes ao itraconazol, de acordo com as informações disponíveis pelo CLSI (2008b). O perfil apresentado por “1”, dentre as três moléculas avaliadas, pode estar relacionado a sua menor cadeia carbônica (8 C), o que confere menor lipofilicidade, dificultando sua ação sobre a célula fúngica.

Com cadeia carbônica de 10 carbonos, a molécula “2” apresentou ação antifúngica superior ao itraconazol diante de *T. mentagrophytes*, *E. floccosum* e das duas cepas de *C. albicans*. Seus valores de CIM e CFM ainda foram menores que o da anfotericina B frente às leveduras. Tais resultados demonstram sua eficácia diante dos principais agentes etiológicos de *tinea unguium*.

Com os menores valores de CIM e CFM, a molécula “3” proporcionou os menores valores de CIM, na faixa de 0,46 a 1.000 µg/mL, sendo considerado agente com potencial fungicida diante das cinco cepas fúngicas analisadas. Seu destaque em relação às demais moléculas é sugestivo pela maior extensão da cadeia carbônica (12 C), o que proporciona o aumento da sua característica lipofílica. Este dado pode favorecer a penetração na célula e facilitar sua ação fungicida, que pode ser corroborado com o estudo de Souza Fernandes e colaboradores (2016), no qual observaram que a lipofilicidade foi fundamental para a atividade antimicrobiana *in vitro* de compostos da classe amino álcoois. No entanto, é importante ressaltar que o aumento da cadeia carbônica pode ser um fator negativo para a ação antifúngica, pois pode representar um impedimento físico para a permeação da célula fúngica.

Por outro lado, Almeida e colaboradores (2013) avaliaram o potencial antifúngico de compostos amino álcoois e concluíram que em uma série de moléculas sintetizadas com cadeia lateral variando de 4 a 14 átomos de carbono, a que apresentou melhor ação frente a cepas de *Candida* spp. foi a que possuía 9 C em sua cadeia alquila lateral.

Em outro estudo, Krauss e colaboradores (2014), ao avaliarem a atividade antifúngica e antibacteriana de compostos *N*-alquil-*trans*-decahidro isoquinolínicos concluíram que a ação biológica estava ligada diretamente ao comprimento da cadeia alquila, sendo a melhor ação atribuída a cadeias com

10 – 12 C. Tang e colaboradores (2015) ao analisar o potencial antifúngico de moléculas orgânicas também constataram que o comprimento do radical alquila é o determinante dessa atividade. Esses estudos ajudam a justificar os dados da Tabela 6, onde a molécula “3” com 12 C na cadeia lateral foi a mais eficaz quando comparada a “1” (8 C) e “2” (10 C).

A cepa de *E. floccosum* CCF-IOC-3757 revelou-se resistente aos fármacos (cetoconazol [ $> 640 \mu\text{g/mL}$ ], itraconazol [ $> 64 \mu\text{g/mL}$ ], terbinafina [ $> 480 \mu\text{g/mL}$ ] e amorolfina [ $> 16 \mu\text{g/mL}$ ]) e elevados valores de CIM e CFM para as três moléculas. Por outro lado, Khosravi e colaboradores (2013) avaliaram 19 isolados desta espécie, os quais apresentaram média de CIM e CFM, respectivamente, de 0,5 e 1,0  $\mu\text{g/mL}$  para a terbinafina e 1,5 e 3  $\mu\text{g/mL}$  para o itraconazol. Em um terceiro estudo, Jo Siu e colaboradores (2013) encontraram CIM entre 0,031 e 0,063  $\mu\text{g/mL}$  para a terbinafina, 0,063 e 0,13  $\mu\text{g/mL}$  para o itraconazol e CIM na faixa de 0,13 e 0,25  $\mu\text{g/mL}$  para a amorolfina frente a três isolados clínicos de *E. floccosum*.

Embora Achterman e White (2012) mencionem que são raros os casos de resistência a antifúngicos, ao estabelecer uma comparação entre estes três estudos, é possível observar que a cepa de *E. floccosum* do presente trabalho, mesmo sendo considerada padrão, revelou elevado “nível” de resistência. Como foi visto, esta espécie é de grande importância para as dermatomicoses e revelou reduzida susceptibilidade às três classes de antifúngicos que possuem mecanismos de ação distintos. Desta forma, os resultados sugerem que “1”, “2” e “3” podem revelar possíveis novos sítios de ação e que poderia implicar em uma inovação no tratamento antifúngico. Percebe-se ainda que a terbinafina, um fármaco com excelente ação frente aos dermatófitos, não está sendo eficaz frente a esta espécie fúngica, o que pode ser justificado pelas modificações ocasionadas pelo pleomorfismo sofrido (ELSAYED, 2015).

O cetoconazol apresentou ação antifúngica com CIM e CFM de 0,25 e 0,25  $\mu\text{g/mL}$  para o *T. mentagrophytes* ATCC 11481 e 1 e 4  $\mu\text{g/mL}$  para *T. rubrum* CCT 5507 URM 1666, respectivamente. Estes resultados confirmam seu potencial para o tratamento de infecções por *Trichophyton* spp. (PEREIRA; MENDES; LIMA, 2013). Diante do *E. floccosum* CCF-IOC-3757, o respectivo fármaco demonstrou CIM  $> 640 \mu\text{g/mL}$ , o que revela sua ineficácia para esta

cepa ou a possibilidade deste episódio ser justificado pelo possível pleomorfismo sofrido.

*T. mentagrophytes* ATCC 11481 e *T. rubrum* CCT 5507 URM 1666 são cepas de referência e apresentaram valores reduzidos de CIM frente ao cetoconazol (0,25 µg/mL e 1 µg/mL, respectivamente). Este mesmo fármaco ao ser avaliado por Mahboubi e Kazempour (2015) frente a duas outras cepas de referência das mesmas espécies obtiveram CIM de 17,5 µg/mL e 20,2 µg/mL.

Contrariamente, no estudo de Méndez-Tovar e colaboradores (2007), duas cepas de *T. rubrum* foram isoladas de pacientes no México diagnosticados com onicomicose, as quais apresentaram valores de CIM para o cetoconazol 0,032 e 0,003 µg/mL e 0,25 e 0,064 µg/mL para o itraconazol; valores que são inferiores aos demonstrados na Tabela 6. Isto demonstra maior resistência aos antifúngicos mesmo em cepas padrão deste estudo, além de corroborar os casos de resistência frente aos azólicos já descritos (BUSCA; TORTORANO; PAGANO, 2015). Entre os mecanismos associados à resistência já foram identificados dois transportadores, TruMDR1 e TruMDR2, os quais podem estar associados à resistência a vários fármacos antifúngicos (ALIPOUR; MOZAFARI, 2015). Outra razão para elevar os valores de CIM é a capacidade de formar biofilme, atribuída ao *T. rubrum* (FEKRAZAD et al., 2015; GUPTA; DAIGLE; CARVIEL, 2016).

A cepa de *T. mentagrophytes* ATCC 11481 revelou sensibilidade à terbinafina (CIM e CFM = 0,03 µg/mL). Já Biasi-Garbini e colaboradores (2016) encontraram CFM ≤ 0,004 µg/mL para este fármaco frente a essa mesma cepa. Alipour e Mozafari (2015) avaliaram o potencial antifúngico desta alilamina frente a 29 isolados desta espécie em pacientes com dermatomicoses e observaram CIM entre 0,1 e 5,0 µg/mL. Embora não sejam muito conhecidos os mecanismos de resistência para *T. mentagrophytes* (ALIPOUR; MOZAFARI, 2015), estes resultados demonstraram a ocorrência de menor susceptibilidade ao respectivo antifúngico em cepas de referência idênticas e em isolados clínicos.

*T. rubrum* CCT 5507 URM 1666 revelou CIM = 0,19 µg/mL para a terbinafina; 2,0 µg/mL para o itraconazol e 0,5 µg/mL para a amorolfina (Tabela 6). Jo Siu e colaboradores (2013) realizaram a mesma análise, contudo,

empregaram 130 isolados desta espécie e encontraram CIM entre 0,004 e 0,06 µg/mL para a terbinafina; 0,015 e 0,125 µg/mL para o itraconazol e amorolfina com CIM na faixa de 0,004 e 0,015 µg/mL. Estes dados revelam que mesmo empregando um grande número de isolados clínicos, os valores de CIM foram inferiores aos da cepa de referência do nosso estudo, demonstrando que *T. rubrum* pode apresentar estratégias de resistência aos antifúngicos, podendo ser mais patogênica.

Estudos realizados por Baptista e colaboradores (2015), pertencentes ao mesmo grupo de pesquisa deste trabalho, evidenciaram valores de CIM e CFM de 0,06 µg/mL para a terbinafina frente à cepa de *T. rubrum* CCT 5507 URM 1666, o que difere do presente estudo (CIM e CFM = 0,19 µg/mL). Tais resultados que demonstram a aquisição de uma possível resistência fúngica.

Entre os fatores que contribuem para o mecanismo de resistência aos antifúngicos pode-se citar: a reduzida adesão do paciente à terapia medicamentosa, modificação metabólica ou degradação do fármaco pela célula fúngica, alterações na interação entre o fármaco e o local de ação, além de alterações enzimáticas, mutações pontuais com o aumento do efluxo celular, entre outros (ALIPOUR; MOZAFARI, 2015).

Os elevados valores de CIM e CFM obtidos neste trabalho frente a *T. mentagrophytes* ATCC 11481, *T. rubrum* CCT 5507 URM 1666, *E. floccosum* CCF-IOC-3757 e *C. albicans* podem ser justificados pelo desenvolvimento de resistência fúngica, a qual pode estar associada a causas genéticas e ambientais e repiques, assim como a presença de biofilme, uma vez que Gupta, Daigle e Carviel (2016) descreveram que essas espécies possuem a capacidade de formar este fator de virulência.

Embora o itraconazol possua indicação para o tratamento de infecções por *C. albicans* (ELSAYED, 2015; KERAI et al., 2016; ROBERTS; TAYLOR; BOYLE, 2003), ao analisar a Tabela 6, ambas as cepas de *C. albicans* se comportaram como resistentes ao itraconazol, o que corrobora a realidade de que esta espécie apresente resistência a diversos antifúngicos disponíveis no mercado (MCCARTY; PAPPAS, 2016; TOREY et al., 2016). Por outro lado, as três moléculas foram fungicidas frente às mesmas.

As cepas de *C. albicans* ATCC 10231 e isolado clínico apresentaram os respectivos valores de CIM e CFM iguais a 0,33 e 3,33 µg/mL e 0,08/ 0,80 µg/mL frente a nistatina; 125 e 500 µg/mL e 78 e 312,50 µg/mL para a anfotericina B, respectivamente. Estes, por sua vez, contradizem o dado de isolados clínicos serem mais resistentes do que as cepas de referência. Zalacain e colaboradores (2006) encontraram valor de CIM = 0,1 µg/mL para a nistatina frente a *C. albicans* isolada de paciente com onicomicoses; valores que são inferiores aos resultados das duas cepas avaliadas, o que permite observar a aquisição de resistência à nistatina.

A anfotericina B teve CIM e CFM de 125 e 500 µg/mL para *C. albicans* ATCC 10231 e 78/ 312,50 µg/mL para o isolado clínico (Tabela 6), respectivamente, o que indica maior resistência fúngica atribuída à cepa de referência. Segundo Guntang e colaboradores (2017), em seu trabalho a *C. albicans* ATCC 10231 também apresentou elevado valor de CIM (32 µg/mL) diante deste mesmo polieno. Esta cepa padrão também foi avaliada por Kumar e Shukla (2010), os quais observaram a elevação do valor de CIM de 0,06 µg/mL para 128 µg/mL após a realização de 60 passagens/ repiques. Contrariamente, Bondaryk, Kurzatkowski e Staniszewska (2013) afirmam que este acontecimento não é algo comum, mas os resultados sugerem uma possível resistência fúngica.

Em outro trabalho, a cepa ATCC 10231 ainda foi avaliada por Tobudic e colaboradores (2009) e Akhalwaya, Vuuren e Patel (2018), os quais encontraram CIM de 0,25 µg/mL e 0,39 µg/mL para a anfotericina B. Desta forma, os dados confirmam a hipótese de resistência fúngica atribuída a esta cepa. Tal situação vem sendo relatada em outros estudos como o de Bailly e colaboradores (2016) que realizaram a identificação e avaliação antifúngica de isolados de *Candida* spp. no período de 2004 a 2013 e observaram o aumento no número de casos de infecção por isolados de *Candida* spp. e o surgimento de resistência fúngica. Segundo Kumar e Shukla (2010), o desenvolvimento de resistência aos antifúngicos pode estar associado a inúmeras causas, dentre elas está a redução do percentual de ergosterol, ocasionada pela mutação no gene ERG11 e expressão excessiva das bombas de efluxo.

Isto posto, os resultados de CIM e CFM dos compostos “1”, “2” e “3” são importantes, uma vez que podem contribuir para minimizar e/ ou solucionar este problema.

## 5.2 Microscopia eletrônica de varredura

Por meio das eletromicrografias, foi possível observar alterações morfológicas nas estruturas fúngicas quando submetidas ao tratamento com substâncias antifúngicas (moléculas e fármacos de referência).

Na espécie de *T. mentagrophytes* ATCC 11481, foram observadas hifas jovens cilíndricas, alongadas, ramificadas e com superfícies lisas e ausência de microconídios (Figura 33A), assim como foi relatado por Inouye e colaboradores (2006) e Tatsumi e colaboradores (2013) em eletromicrografias desta mesma espécie. McCartyhy (2004) realizou a descrição de *T. mentagrophytes* de forma semelhante, número reduzido de macroconídios e microconídios agrupados em forma de uva, o que caracteriza este micro-organismo. Park e colaboradores (2009) realizaram, por meio de MEV, a descrição desta cepa pela presença de hifas cilíndricas com 2 µm de diâmetro e a presença de grande quantidade de ramificações; descrição esta que é equivalente à revelada por este estudo.

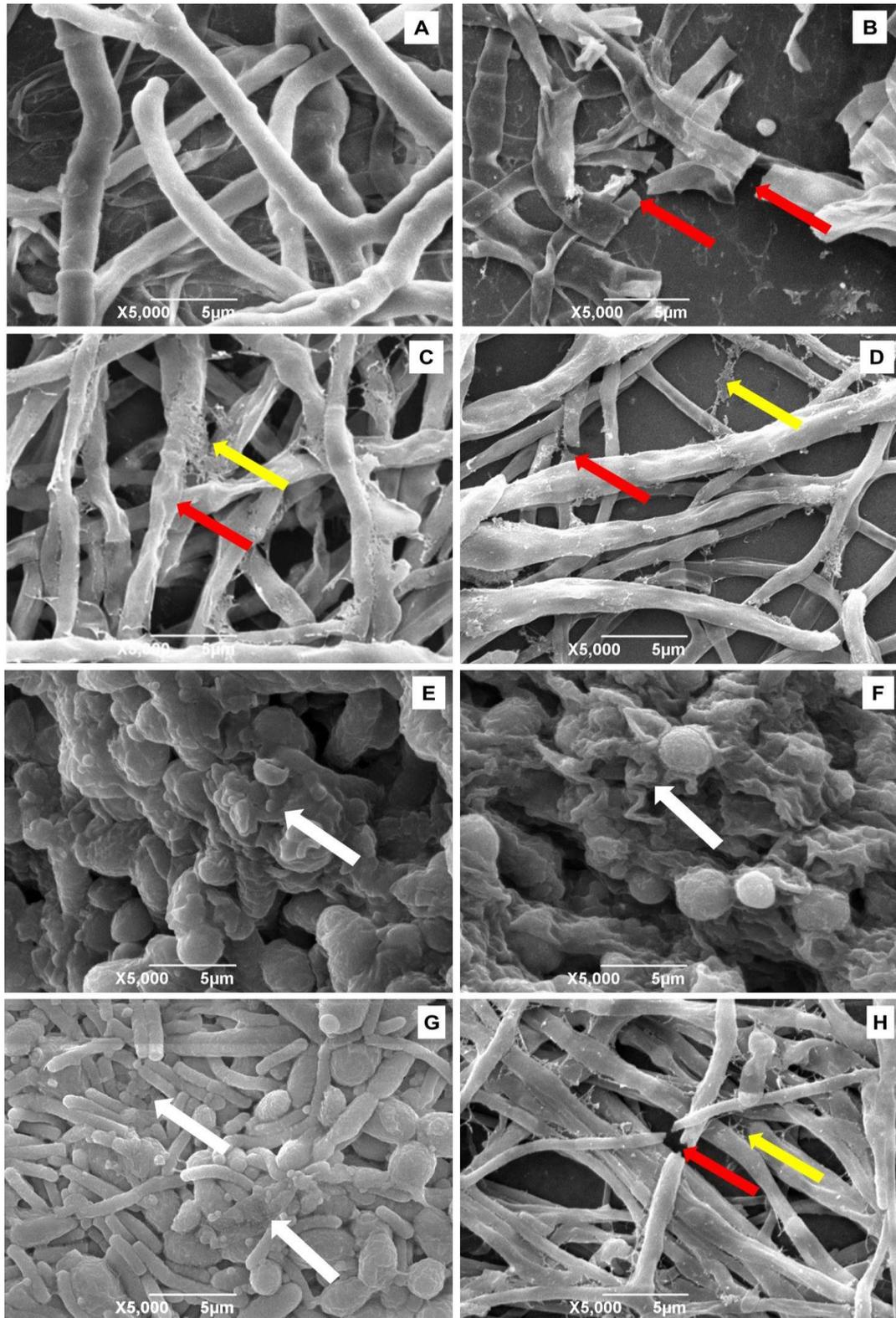


Figura 33: Micrografias eletrônicas de *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11481.

Fungo não submetido ao tratamento (A); fungo submetido ao tratamento com: molécula "1" (B); molécula "2" (C); molécula "3" (D); Terbinafina (E); Cetoconazol (F), Itraconazol (G) e Amorolfina (H). Seta: vermelha (quebras), amarela (extravasamento de material intracelular) e branca (compactação). Aumento de 5.000 X.

Fonte: O autor (2018).

Após o tratamento com as moléculas “1”, “2” e “3”, percebeu-se a ocorrência de rupturas e planificação das hifas, assim como extravasamento de material intracelular (Figuras 33 B, C e D), o que sugere a ocorrência de lise celular. Tal resultado se diferencia da ação proporcionada pelo cetoconazol e terbinafina (Figuras 33 E e F, respectivamente), uma vez que estes fármacos proporcionaram a compactação de todo o micélio. Similarmente, Rashid; Scott e Richardson (1995) também observaram a fragmentação das hifas além da compactação das mesmas quando *T. mentagrophytes* foi exposto à terbinafina.

Já na cepa de *T. rubrum*, foi possível observar emaranhado de hifas cilíndricas e microconídios esféricos aderidos em toda sua extensão com tamanho variando de 2 a 3  $\mu\text{m}$  (Figura 34 A); características semelhantes foram descritas por McCartyhy (2004). Esta cepa, quando tratada com os amino álcoois “1”, “2” e “3”, apresentou achatamento das hifas, seguida de quebras e microconídios inalterados (Figuras 34 B, C e D). Este comportamento foi semelhante ao proporcionado pela terbinafina e itraconazol (Figuras 34 E e G, respectivamente). Diante do cetoconazol e amorolfina (Figuras 34 F e H, respectivamente) foram observadas deformações mais expressivas em todo o micélio, o qual se tornou uma massa compacta, além de não permitir a identificação dos microconídios.

Na Figura 34 F é possível visualizar a alteração morfológica ocasionada pelo cetoconazol, o que demonstra sua eficácia farmacológica e ajuda a compreender seu emprego como um dos antifúngicos de referência.

Nos trabalhos desenvolvidos por Zimmerman-Franco e colaboradores (2013) e Caneschi e colaboradores (2015) neste grupo de pesquisa, foi possível evidenciar por meio da MEV as mesmas características morfológicas apresentadas para as cepas de *T. mentagrophytes* ATCC 11481 e *T. rubrum* CCT 5507 URM 1666 não submetidas ao tratamento antifúngico.

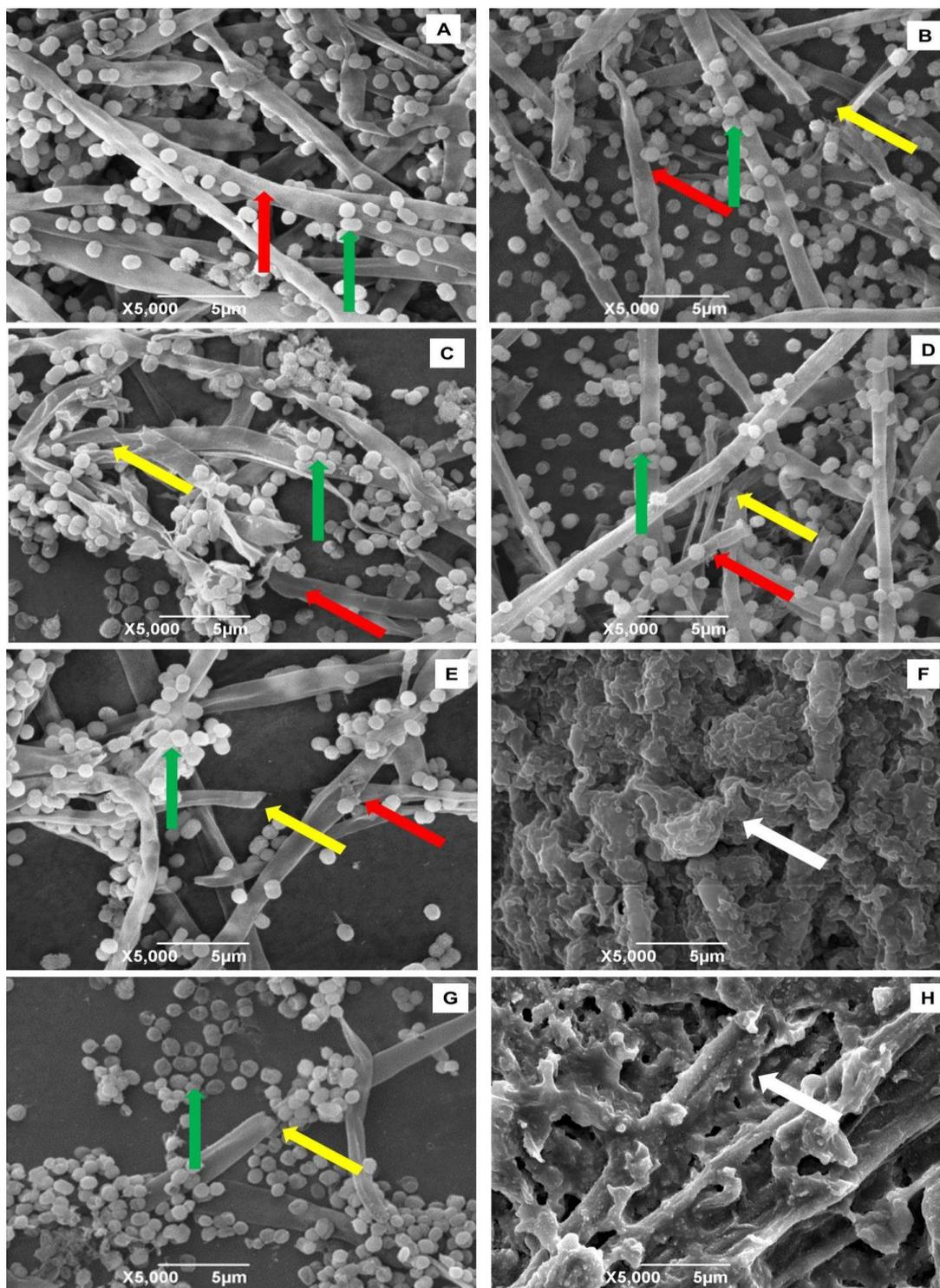


Figura 34: Micrografias eletrônicas de *Trichophyton rubrum* CCT 5507 URM 1666.

Fungo não submetido ao tratamento (A); fungo submetido ao tratamento com: molécula “1” (B); molécula “2” (C); molécula “3” (D); Terbinafina (E); Cetoconazol (F), Itraconazol (G) e Amorolfina (H). Seta: vermelha (hifas), verde (microconídios), amarela (quebras) e branca (compactação). Aumento de 5.000 X.

Fonte: O autor (2018).

Nas eletromicrografias de *E. floccosum* foram observadas a presença de hifas cilíndricas, inteiras e entrelaçadas, além de macroconídios com aspecto de “charuto” e a ausência de microconídios (Figura 35). Tal descrição vai ao encontro com a realizada por McCartyhy (2004) ao analisar as eletromicrografias dessa mesma espécie. Contudo, Guého, Castro; Badillet (1985) descreveram, por meio de MEV, as características desta espécie, com destaque para a presença de macroconídios e estruturas de ornamentação.

Após receber o tratamento com as moléculas orgânicas (“1”, “2” e “3”), foi possível evidenciar a destruição das hifas, a ocorrência de rupturas e planificação das hifas, extravasamento de material intracelular (Figuras 35 B, C e D) e macroconídios destruídos (Figuras 35 C e D). As alterações morfológicas relatadas sugerem que o sítio de ação destas moléculas pode ser a parede celular fúngica, ocasionando a formação de poros nesta estrutura e, conseqüentemente, o extravasamento de material intracelular.

Este resultado também foi observado por Vila; Ronzentel; Sá Guimarães (2015) ao observar micrografias eletrônicas de *Furasium oxysporum* que colonizavam um fragmento de unha. No nosso estudo, não foram capturadas eletromicrografias para os fármacos de referência, pois este micro-organismo foi caracterizado como resistente a todos os fármacos testados.

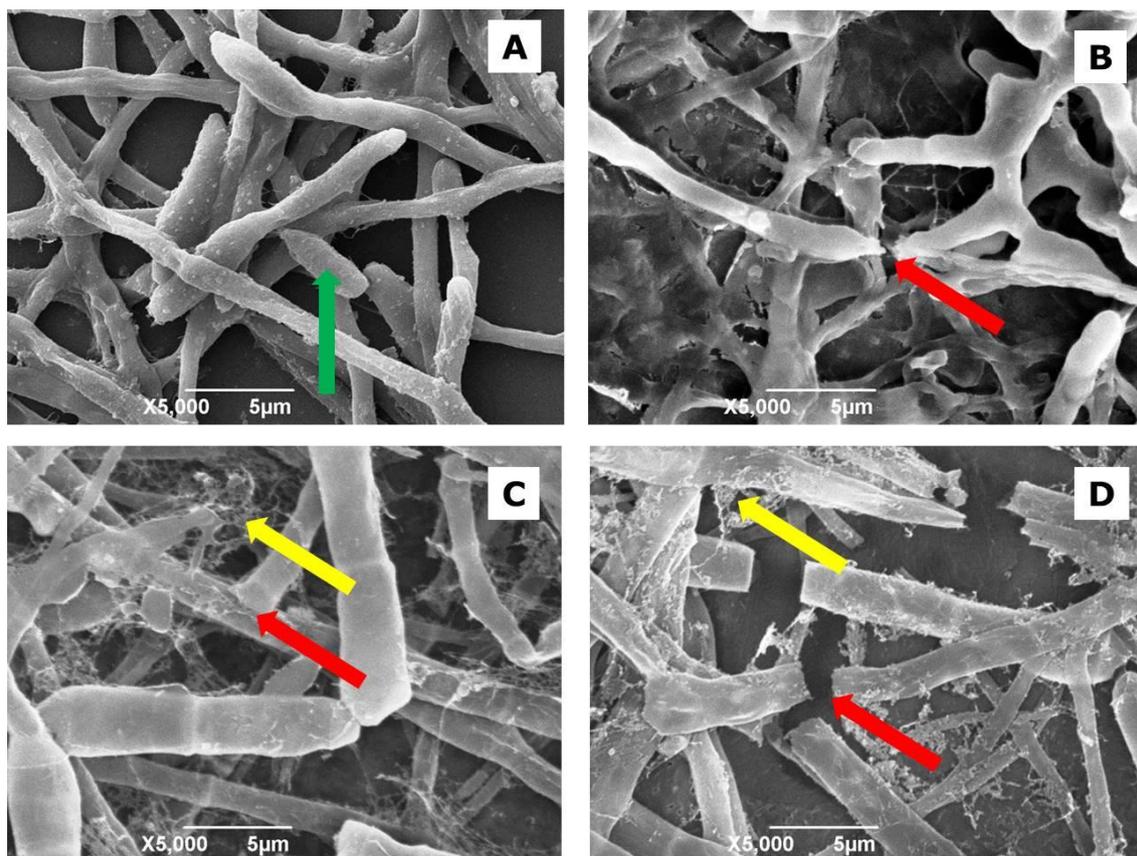


Figura 35: Micrografias eletrônicas de *Epidermophyton floccosum* CCF-IOC-3757.

Fungo não submetido ao tratamento (A); fungo submetido ao tratamento com: molécula “1” (B); molécula “2” (C); molécula “3” (D). Seta: vermelha (quebras), amarela (material intracelular) e verde (macroconídio). Aumento de 5.000 X. Fonte: O autor (2018).

Na caracterização da *C. albicans* ATCC 10231, observamos células ovoides com superfície lisa e agrupadas com tamanho médio de 5 a 7  $\mu\text{m}$  (Figura 36 A). Sendo possível ainda observar o momento da reprodução fúngica por meio do brotamento (Figura 36 A). McCartyhy (2004) mencionou que este micro-organismo possui crescimento em poucos dias, colônias de aspecto cremoso e morfologia, por meio de MEV, semelhante a apresentada na Figura 36 A. O mesmo foi descrito por Bizerra e colaboradores (2011), Hamid e colaboradores (2017), Maurya e colaboradores (2011) e Shreaz e colaboradores (2013), que observaram, por MEV, células com formato elíptico e presença de brotamento, além da formação de pseudo-hifas. Embora Torey e colaboradores (2016) e Martins (2016) tenham observado a formação de biofilme entre as células de *C. albicans*, esta característica não foi evidenciada neste trabalho.

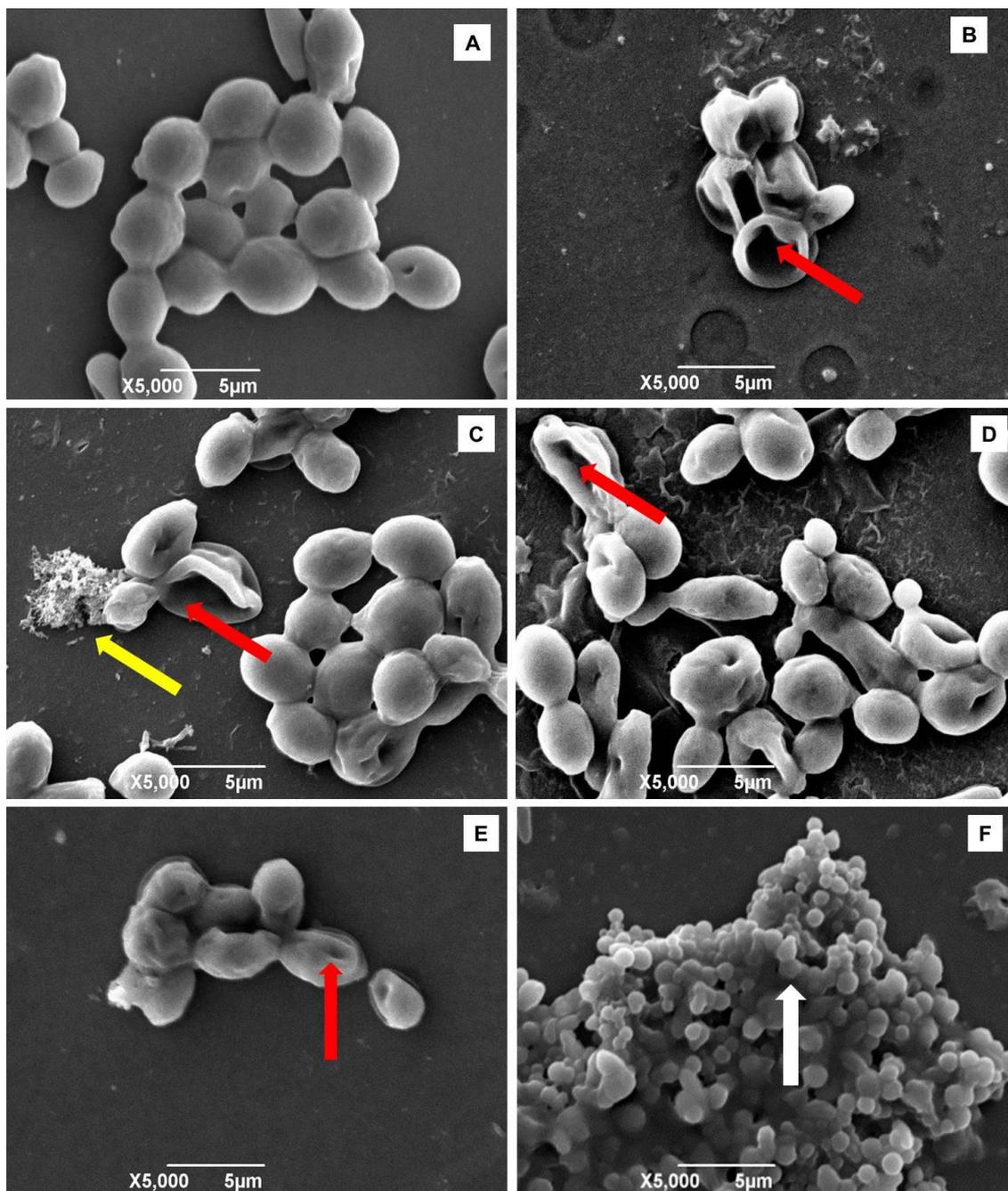


Figura 36: Micrografias eletrônicas de *Candida albicans* ATCC 10231. Fungo não submetido ao tratamento (A); fungo submetido ao tratamento com: molécula “1” (B); molécula “2” (C); molécula “3” (D), anfotericina B (E); nistatina (F). Seta: vermelha (orifícios), amarela (material intracelular) e branca (compactação). Aumento de 5.000 X. Fonte: O autor (2018).

Ao analisar o contato da cepa de *C. albicans* com as moléculas de amino álcoois, foi possível observar a formação de orifícios na sua superfície que se assemelham a poros (Figuras 36 C e D), extravasamento de material intracelular e células com aspecto “murcho” (Figuras 36 B, C e D).

Comportamento similar foi proporcionado pela anfotericina B (Figura 36 E); mas em menor intensidade. Descrição semelhante ao observado nas Figuras 36 C e D foi obtido em análise de MEV para a cepa de *C. albicans* tratada com cinamaldeído, o qual proporcionou a formação de poros e perda de material intracelular (SHREAZ et al., 2013).

De acordo com Schreier, Malheiros e Paula (2000), os compostos anfífilos interagem com membranas e ocasionam inúmeros efeitos como a desorganização dos lípides de membrana, podendo interferir direta ou indiretamente por meio do metabolismo dos fosfolípidos. Isto justifica as alterações encontradas nas eletromicrografias obtidas da espécie de *C. albicans* avaliadas quando submetidas ao tratamento com as moléculas “1”, “2” e “3”, já que houve possível abertura de poros na membrana ocasionada por danos aos fosfolípidos.

Na Figura 36 E, é possível ratificar a ação da anfotericina B com a formação de poros e perfurações na membrana celular que ocasiona, por sua vez, a liberação de material intracelular e, conseqüentemente, o enrugamento da célula fúngica que culmina em sua morte. Por outro lado, a nistatina ocasionou a redução do tamanho das células e o agrupamento das mesmas (Figura 36 F). Embora sua ação seja evidente, a nistatina possui elevada nefrotoxicidade (PERSINOTI, 2012), o que prejudica e/ ou inviabiliza seu uso por tempo prolongado.

### 5.3 Atividade enzimática

Por meio da atividade enzimática foi possível evidenciar a produção de fosfolipase nas espécies de *T. mentagrophytes* ATCC 11481, *E. floccosum* CCF-IOF-3757 e nas duas cepas de *C. albicans* avaliadas (Tabela 7 e Figura 37), assim como descrito por diversos autores (AKÇAĞLAR; ENER; TÖRE, 2011; KUMAR; SHUKLA, 2010; PERES et al., 2010a; PERES et al., 2010b; SACHIN; RUCHI; SANTOSH, 2012) e caracterizadas como “forte” ( $P_z < 0,64$ ). Já o *T. rubrum* CCT 5507 URM 1666 revelou  $P_z = 1,0$ , o que se caracteriza como “ausência” na produção de fosfolipase.

Tabela 7: Valores de Pz para a atividade da enzima fosfolipase

Micro-organismos	Produção de fosfolipase	Moléculas		
		“1”	“2”	“3”
<i>T. mentagrophytes</i> ATCC 11481	0,52	1,0	0,49	0,52
<i>T. rubrum</i> CCT 5507 URM 1666	1,0	-	-	-
<i>E. floccosum</i> CCF IOF 3757	0,5	0,54	0,57	0,56
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0,46	1,0	0,72	1,0
<i>C. albicans</i> isolado clínico	0,5	0,72	0,66	0,57

Pz: razão empregada para cálculo da atividade fosfolipase.

Fonte: O autor (2018).

Na Figura 37 é possível visualizar o halo formado em torno da colônia fúngica por meio da produção de fosfolipase, achado este que corrobora os encontrados por Kadir; Gumru; Uygun-Can (2007) e Mahmoudabadi; Zarrin; Miry (2010).

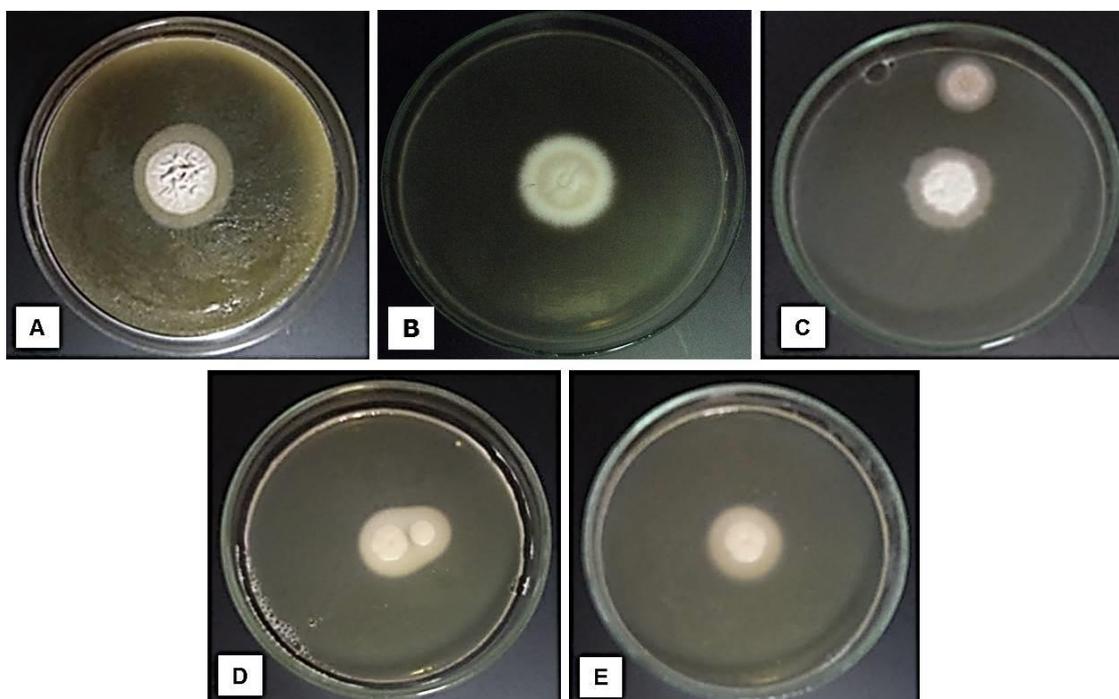


Figura 37: Atividade da fosfolipase de fungos dermatófitos e leveduras sem tratamento com antifúngico.

A: *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11481, B: *T. rubrum* CCT 5507 URM 1666; C: *Epidermophyton floccosum* CCF IOF 3757, D: *Candida albicans* ATCC 10231 e E: *C. albicans* isolado clínico.

Fonte: O autor (2018).

As cepas fúngicas ao serem expostas aos amino álcoois “1”, “2” e “3” apresentaram alterações na produção da fosfolipase de acordo com os parâmetros descritos por Pereria e colaboradores (2011). A molécula “1” foi a mais efetiva e ocasionou a redução na produção enzimática, sendo detectada a “ausência” de produção ( $Pz = 1,0$ ) para as cepas de *T. mentagrophytes* ATCC 11481 e *C. albicans* ATCC 10231, e “moderada” ( $0,64 < Pz < 0,999$ ) para o isolado clínico de *C. albicans*. Embora *E. floccosum* CCF IOF 3757 tenha aumentado o valor de Pz, sua classificação não foi alterada.

A molécula “2” proporcionou interferência na produção enzimática de ambas as cepas de *C. albicans* que passou de “forte” para “moderada”. Já para as demais cepas fúngica, sua presença foi irrelevante para a classificação. Por outro lado, o composto “3” foi efetivo apenas para *C. albicans* ATCC 10231 ao inibir a formação de halo, sendo a produção enzimática caracterizada como “ausência”.

Kumar e Shukla (2010) ao avaliarem a produção de fosfolipase com a mesma cepa de *C. albicans* ATCC 10231 obtiveram valor de Pz igual a 0,66, sendo caracterizada como produção “moderada”. Por outro lado, Guntang e colaboradores (2017) e Tsang e colaboradores (2007) descreveram Pz igual a 0,65 e 0,49, respectivamente, para esta mesma cepa, dados que se assemelham ao da nossa pesquisa que obteve a caracterização como “forte”. Tendo em vista as comparações descritas, é possível observar que, embora seja a mesma cepa, apresentam comportamentos distintos, sendo a do presente estudo possivelmente mais virulenta que as supracitadas.

Em estudo realizado por Sachin; Ruchi e Santosh (2012) foram analisados 39 isolados de *C. albicans*, sendo a produção de fosfolipase evidenciada em 92,3 % destes e comparada à cepa de *C. albicans* ATCC 10231 como controle positivo. Evidência que corrobora a produção de fosfolipase descrita por esta mesma cepa na Tabela 7. Vidotto e colaboradores (1999) também observaram a produção de fosfolipase (“moderada”) em todas as 113 amostras de *C. albicans*.

Em contrapartida, Oliveira e colaboradores (1998) isolaram 25 cepas de *Candida* spp. de amostra bucal de pacientes com câncer e 24 eram *C. albicans*, com produção de fosfolipase “forte” ( $Pz < 0,64$ ), cuja classificação é

equivalente ao apresentado na Tabela 7. Mattei e colaboradores (2013) também observaram fosfolipase em 78 % (120/ 153) dos isolados de *C. albicans*. Assim, percebe-se que a capacidade de produzir fosfolipase está presente na maioria das cepas de *C. albicans*, o que pode ser inerente à espécie e sugere o uso desta como um fator de virulência patognomônico para tal infecção (AKTAS; YIGIT, 2015).

Esta enzima ocasiona a destruição de lipídios da membrana celular que culmina na abertura de poros e assim, permite a permeação das hifas pelo tecido ungueal, invasão do tecido, desenvolvimento e disseminação fúngica (RAMOS et al., 2015). Dessa forma, o desenvolvimento de agentes antifúngicos que consigam reduzir ou inibir a produção de fosfolipase é estratégico (SORRELL et al., 2010). De acordo com Rajput, Karuppaiyl (2013), a capacidade de inibição de um ou mais fatores de virulência, sem matar o patógeno, pode ser valioso para evitar a seleção natural e a emergência de micro-organismos resistentes a fármacos.

A produção de fosfolipase contribui para a colonização e infecção fúngica, sendo mais evidente em isolados fúngicos obtidos de pacientes quando comparados às cepas padrão (ISHIDA et al., 2012; PATEL; GULUBE; DUTTON, 2009; SUN et al., 2017). Contrariamente, este achado não foi evidenciado quantitativamente nos resultados listados na Tabela 7.

Outro mecanismo de virulência fúngica identificado foi a produção de melanina, a qual foi observada nas cepas de *T. mentagrophytes* ATCC 11481 e *C. albicans* (Tabela 8).

Tabela 8: Produção de melanina por diferentes espécies fúngicas

Micro-organismo	Produção de melanina			
	Sem tratamento	Moléculas		
		"1"	"2"	"3"
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 11481	+	+	+	+
<i>Trichophyton rubrum</i> CCT 5507 URM 1666	-	NA	NA	NA
<i>Epidermophyton floccosum</i> CCF-IOC-3757	-	NA	NA	NA
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i> isolado clínico	+	+	+	+

"+": presença; "-": ausência; NA: não analisada.

Fonte: O autor (2018).

A melanina possui elevado peso molecular e coloração marrom escuro, sendo produzidas por muitos fungos (ALMEIDA-PAES et al., 2015; YU et al., 2015). Em 2011, Hay e Baran descreveram os tipos de onicomicoses, dentre os quais a onicomicose superficial, ocasionada por *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*, são caracterizadas pela leuconíquia e/ou coloração escura da unha. Esta por sua vez é ocasionada pela produção de melanina, o que corrobora a produção de melanina pela cepa de *T. mentagrophytes* apresentada na Tabela 8.

Após submeter as cepas produtoras de melanina à ação das moléculas “1”, “2” e “3”, estas não ocasionaram nenhuma alteração qualitativa na produção de melanina (Tabela 8), revelando assim, que os amino álcoois avaliados possuem alvo de ação distinto da produção de melanina, podendo ser um outro fator de virulência como a fosfolipase ou queratinase, uma vez que a virulência fúngica é uma característica multifatorial (ALMEIDA-PAES et al., 2015).

As diferentes manifestações observadas em relação à produção de fosfolipase e melanina podem ser justificadas pela possível ocorrência de pleomorfismo nos dermatófitos, uma vez que o armazenamento por longos períodos pode resultar na perda de características colonizáveis reconhecíveis e na superprodução de micélio estéril. Este fenômeno se expressa através da perda das estruturas de reprodução ou conídios, com variações morfológicas da colônia e produção de pigmentos diminuída. Sendo essa uma possível justificativa para o resultado obtido neste trabalho.

#### **5.4 Avaliação da citotoxicidade**

A análise de citotoxicidade foi realizada com o propósito de identificar possíveis danos que os derivados amino álcoois poderiam ocasionar quando empregado via tópica, uma das principais vias empregadas para o tratamento das onicomicoses.

Desta forma, foi possível observar que as moléculas “1”, “2” e “3” apresentaram relativa toxicidade frente às células L929 e HaCaT (Figura 38). A molécula “1” apresentou viabilidade celular acima de 50 % até a concentração de 125 µg/mL para L929. Frente a HaCaT, essa apresentou viabilidade celular

inferior a 50 % nas concentrações maiores que 125 µg/mL, mas todas concentrações avaliadas apresentaram diferença considerada estatisticamente significativa comparada ao controle quando  $p < 0,05$ .

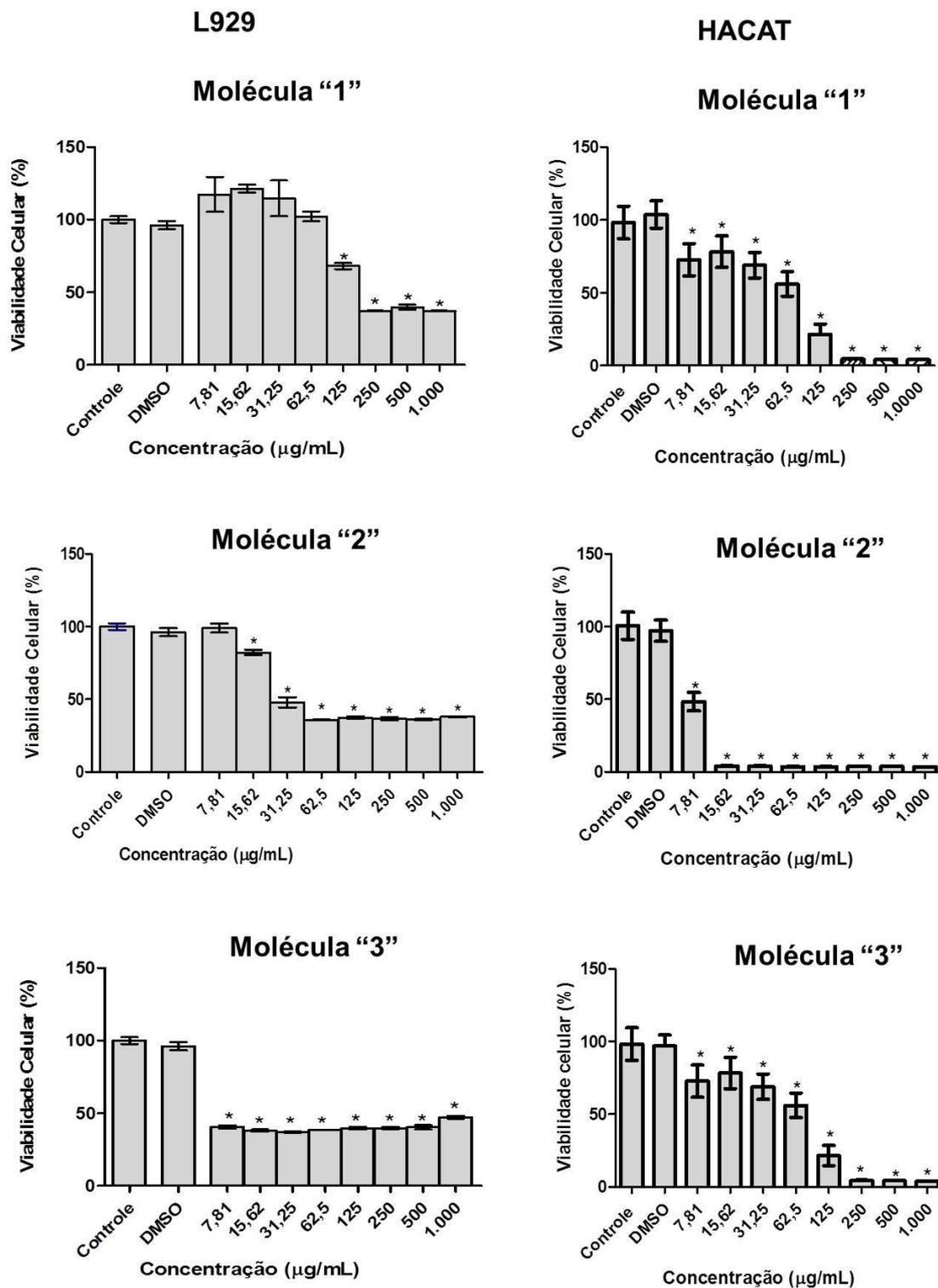


Figura 38: Avaliação de citotoxicidade das moléculas "1", "2" e "3" frente a fibroblastos (L929) e queratinócitos (HaCaT).

DMSO: dimetilsulfóxido. Valores expressos pela média  $\pm$  desvio padrão, \*: diferença considerada estatisticamente significativa comparada ao controle quando  $p < 0,05$ .

Fonte: O autor (2018).

O amino álcool “2” apresentou viabilidade celular inferior a 50 % para L929 nas concentrações acima de 31,25 µg/mL, mas apenas a concentração de 7,81 µg/mL não revelou diferença estatisticamente significativa comparada ao controle quando  $p < 0,05$ . Frente à células HaCaT, não houve viabilidade superior a 50 % em concentrações maiores de 0,125 µg/mL. Ao realizar uma comparação com seu potencial fungicida atribuído a concentrações superiores a 0,125 µg/mL, percebe-se que apresenta considerável toxicidade.

Por último, a molécula “3” não proporcionou viabilidade celular maior que 50 % para L929 em todas as concentrações avaliadas. Frente à células HaCaT, a viabilidade celular foi superior a 50 % até 62,5 µg/mL e a partir de 125 µg/mL foi inferior a 25 %. Além disso, diante as células de L929 e HaCaT, todas as concentrações avaliadas apresentaram diferença considerada estatisticamente significativa comparada ao controle quando  $p < 0,05$ .

Embora “1”, “2” e “3” possuam semelhança estrutural, diferenciando-se apenas pelo número de CH<sub>2</sub>, não foi possível estabelecer uma relação entre o tamanho da cadeia carbônica e o percentual de viabilidade celular ao avaliar as duas células concomitantemente. Ao avaliar a ação dessas moléculas frente a L929, percebe-se que o aumento do número de CH<sub>2</sub> ocasiona a redução da viabilidade celular. Analisando a viabilidade das células HaCaT submetidas ao tratamento com “1”, “2” e “3”, observa-se que a molécula “2”, com número intermediário de carbonos (10 C), apresentou maior toxicidade. Assim, os amino álcoois “1” e “3” foram menos tóxicos diante desta célula avaliada.

Wang e colaboradores (2017) avaliaram também derivados amino álcoois diante de fibroblasto pulmonar embrionário humano WI38 e observaram concentração citotóxica de 50% de 2,899 µg/mL. Caneschi e colaboradores (2017) avaliaram a citotoxicidade de derivados de amino álcoois frente a macrófagos J774 e observaram viabilidade celular superior a 50 % em concentrações ≤ 10 µg/mL, o que se assemelha com os resultados do presente estudo.

É importante ressaltar a citotoxicidade como algo desejável em alguns momentos, caso esta seja específica para células tumorais como foi evidenciado no estudo de Souza Fernandes e colaboradores (2016), que observaram toxicidade seletiva de amino álcoois para células tumorais de

adenocarcinoma de mama (MCF-7), adenocarcinoma cervical (HeLa) e glioblastoma (MO59J). Desta forma, sugere-se a avaliação da citotoxicidade das moléculas “1”, “2” e “3” frente a diferentes tipos celulares, uma vez que podem apresentar toxicidade seletiva para células tumorais.

Em relação aos fármacos de referência, suas citotoxicidades frente às células L929 e HaCaT podem ser observados nas Figuras 39 e 40. Por meio destas, observa-se que a viabilidade celular, proporcionada pelos principais fármacos antifúngicos empregados no tratamento de onicomicoses e avaliados neste trabalho foi superior a 50 % em todas as concentrações avaliadas.

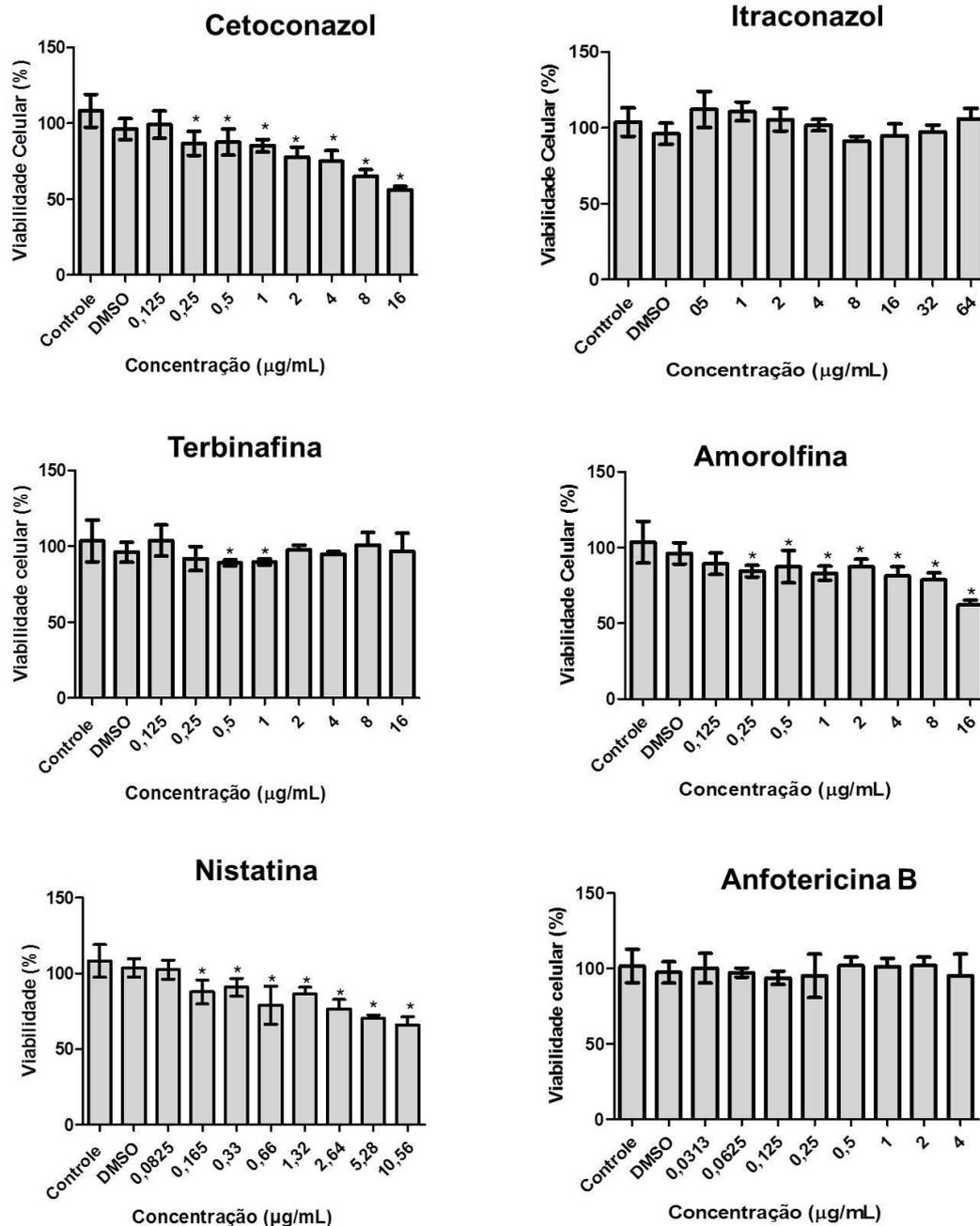


Figura 39: Avaliação de citotoxicidade dos fármacos de referência frente a fibroblastos murinos (L929).

DMSO: dimetilsulfóxido. Valores expressos pelo média  $\pm$  desvio padrão, \*: diferença considerada estatisticamente significativa comparada ao controle quando  $p < 0,05$ .

Fonte: O autor (2018).

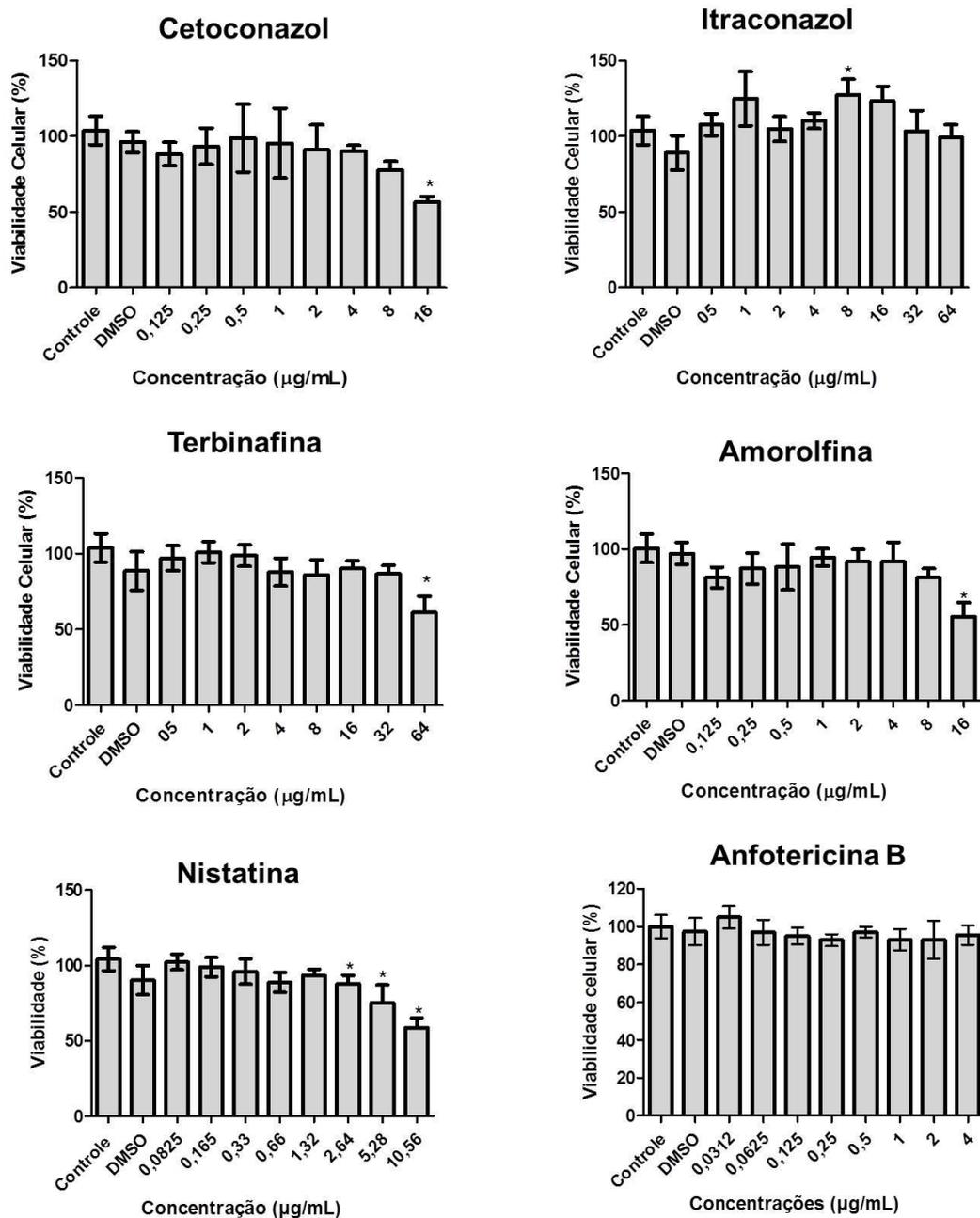


Figura 40: Avaliação de citotoxicidade dos fármacos de referência frente aos queratinócitos (HaCaT).

DMSO: dimetilsulfóxido. Valores expressos pelo média  $\pm$  desvio padrão, \*: diferença considerada estatisticamente significativa comparada ao controle quando  $p < 0,05$ .

Fonte: O autor (2018).

Os azóis, cetoconazol e itraconazol, embora pertencentes à mesma classe de antifúngicos, apresentaram toxicidades distintas. O primeiro com valores de CIM de 0,25 µg/mL a > 640 µg/mL, revelou viabilidade celular superior a 50 % nas concentrações ≤ 8 µg/mL para L929 e HaCaT. Somado a este acontecido, o cetoconazol é um fármaco de uso oral que pode ocasionar efeitos adversos como hepatotoxicidade (AHMAD et al., 2010; KATHIRAVAN et al., 2012; MURDAN, 2016; TUCKER, 2015; GUPTA; PAQUET; SIMPSON, 2013). Já o itraconazol revelou percentual de viabilidade celular na faixa de 91,26 a 124 % em todas as concentrações avaliadas para ambas as células, contudo, ocasiona toxicidade hepática como relata Murdan (2016).

A terbinafina apresentou viabilidade celular no intervalo de 89,06 a 103,83 % para L929 até a 16 µg/mL (concentração limite estabelecida pelo CLSI [2008b]). De forma semelhante, frente a HaCaT a viabilidade celular foi de 86,07 a 90,15 %. Assim, estes resultados ajudam a justificar a realidade de ser um dos fármacos mais prescritos para o tratamento de onicomicoses (CHERNOFF; SCHER, 2016) e com reduzidos efeitos tóxicos (DIOGO et al., 2010).

Assim como os resultados obtidos neste trabalho, Valdes e colaboradores (2017), ao analisarem formulações tópicas contendo a terbinafina, também não observaram toxicidade frente a células HaCaT. Por outro lado, Hjira e colaboradores (2017) identificaram necrose de queratinócitos em pacientes com psoríase tratado com esta alilamina, o que revela ser um caso específico.

Em estudo realizado por Kanda e colaboradores (2011), os fármacos terbinafina e itraconazol não apresentaram citotoxicidade frente aos queratinócitos oriundos de prepúcio neonatal humano em concentrações inferiores a 29,14 µg/mL e 70,5 µg/mL, respectivamente.

Em relação à nistatina, os valores da CIM e da CFM ficaram na faixa de 0,08 a 3,33 µg/mL; já sua viabilidade celular foi de 102,47 a 76,62 % para L929 e de 102,34 a 87,95 % para HaCaT até a concentração de 2,64 µg/mL, o que não indica toxicidade relativa. Comportamento semelhante ocorreu com a anfotericina B, a qual apresentou viabilidade celular de 95,52 % mesmo nas

maiores concentrações avaliadas (4,0 µg/mL) para fibroblastos (L929) e queratinócitos (HaCaT).

Embora a viabilidade celular da anfotericina B tenha sido próximo a 100 %, este fármaco apresenta nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, arritmia cardíaca e toxicidade hematológica (anemia, leucopenia e trombocitopenia) (FALCI, PASQUALOTTO, 2015; OLIVEIRA, 2012b). Uribe e colaboradores (2013) avaliaram a citotoxicidade *in vitro* da anfotericina B diante das células hepáticas GRX, Hep G2 e ARL-6 e observaram redução da viabilidade celular (67,2 % e 30,8 %) frente as células GRX nas concentrações de 1,25 e 2,50 µg/mL respectivamente, o que revela sua toxicidade para estas células. No entanto, nas concentrações testadas, a anfotericina B não alterou a viabilidade celular das demais linhagens supra-citadas.

Diante dos resultados apresentados, percebe-se que as moléculas “1”, “2” e “3” apresentaram notória toxicidade quando comparada aos fármacos de referência empregados clinicamente e avaliados neste estudo. Tal fato poderia ser um entrave para o desenvolvimento de formulações de uso tópico. Contrariamente, essas podem possuir mecanismos de ação diferentes dos tradicionalmente conhecidos, o que pode impulsionar o desenvolvimento/síntese de novos compostos, ou ainda, o seu uso como coadjuvante ao tratamento medicamentoso já existente para onicomicoses.

## 6 CONCLUSÃO

Foram analisadas cinquenta moléculas das classes de diaminas e amino álcoois, as quais apresentaram ação antifúngica diante de *T. mentagrophytes* ATCC 11481, *T. rubrum* CCT 5507 URM 1666, *E. floccosum* CCF-IOF-3757, *C. albicans* ATCC 10231 e uma cepa clínica de *C. albicans*.

As diaminas “7”, “8” e “16” apresentaram os melhores valores de CIM diante das cepas fúngica avaliadas, no entanto, diante da reduzida hidrossolubilidade e disponibilidade de massa, foram selecionadas três amino álcoois para o estudo.

Os amino álcoois “1”, “2” e “3” apresentaram potencial antifúngico frente às principais espécies causadoras de onicomicoses. Estas revelaram ação fungicida frente às cepas de *T. mentagrophytes* ATCC 11481, *T. rubrum* CCT 5507 URM 1666, *E. floccosum* CCF-IOF-3757, *C. albicans* ATCC 10231 e uma cepa de origem clínica de *C. albicans* com CIM na faixa de 0,462 µg/mL a 1.000 µg/mL com destaque para a molécula “2” com número intermediário de carbonos em sua cadeia alifática (12 C), sendo mais efetivo que alguns fármacos de referência

Por meio das eletromicrografias, foi possível evidenciar as alterações morfológicas ocasionadas pelas moléculas e fármacos de referência diante das cinco cepas fúngicas avaliadas.

As moléculas “1”, “2” e “3” revelaram potencial de redução e inibição da produção da fosfolipase.

Ao avaliar a citotoxicidade dessas moléculas, observou-se que a melhor taxa de viabilidade celular foi proporcionada pela molécula “1” frente a fibroblastos (L929) e queratinócitos (HaCaT), seguida de “3”, sendo a molécula “2” a que revelou maior citotoxicidade.

Os resultados obtidos neste trabalho revelam três novos compostos orgânicos sintéticos com atividade antifúngica, o que contribui para a síntese de possíveis novos fármacos para o tratamento de micoses, cujos agentes etiológicos sejam os avaliados neste estudo.

## REFERÊNCIAS

- ABONIA, R. et al. A straightforward and efficient method for the synthesis of diversely substituted  $\beta$ -aminoketones and  $\gamma$ -aminoalcohols from 3-(*N,N*-dimethylamino)propiophenones as starting materials. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 9, p. 1396-1402, 2013.
- ACHTERMAN, R. R.; WHITE, T. C. A foot in the door for dermatophyte research. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 3, p. 1-4, 2012.
- AHMAD, A. et al. Evolution of ergosterol biosynthesis inhibitors as fungicidal against *Candida*. **Microbial Pathogenesis**, v. 48, n. 1, p. 35-41, 2010.
- AJORI, S.; ANSARI, R.; DARVIZEH, M. Vibration characteristics of single- and double-walled carbon nanotubes functionalized with amide and amine groups. **Physica B: Condensed Matter**, v. 462, p. 8-14, 2015.
- AKÇAĞLAR, S.; ENER, B.; TÖRE, O. Acid proteinase enzyme activity in *Candida albicans* strains : a comparison of spectrophotometry and plate methods. **Turkish Journal of Biology**, v. 35, n. 5, p. 559-567, 2011.
- AKHALWAYA, S.; VUUREN, S. V.; PATEL, M. An *in vitro* investigation of indigenous South African medicinal plants used to treat oral infections. **Journal of Ethnopharmacology** v. 210, p. 359–371, 2018.
- AKTAS, E.; YIGIT, N. Hemolytic activity of dermatophytes species isolated from clinical specimens. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 25, n. 1, p. e25-e30, 2015.
- ALALLA, A. et al. Easy kinetic resolution of some  $\beta$ -amino alcohols by *Candida antarctica* lipase B catalyzed hydrolysis in organic media. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 27, n. 24, p. 1253-1259, 2016.
- ALIPOUR, M.; MOZAFARI, N. A. Terbinafine susceptibility and genotypic heterogeneity in clinical isolates of *Trichophyton mentagrophytes* by random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Journal de Mycologie Médicale**, v. 25, n. 1, p. e1-e9, 2015.
- ALMEIDA, L. M. M de et al. Resposta in vitro de fungos agentes de micoses cutâneas frente aos antifúngicos sistêmicos mais utilizados na dermatologia. **Revista Brasileira de Dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 249-255, 2009.
- ALMEIDA, A. M. de et al. Synthesis and antimicrobial activity of novel amphiphilic aromatic amino alcohols. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 10, p. 2883-2887, 2013.

ALMEIDA-PAES, R. et al. Biosynthesis and functions of a melanoid pigment produced by species of the *Sporothrix* complex in the presence of L-Tyrosine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 24, p. 8623-8630, 2012.

\_\_\_\_\_ et al. Phenotypic characteristics associated with virulence of clinical isolates from the *Sporothrix complex*. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-10, 2015.

\_\_\_\_\_ et al. Melanins protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the antifungal effects of terbinafine. **Plos One**, v. 11, n. 3, p. 1-13, 2016.

ALOMRANI, A. H.; AL-AGAMY, M. H.; BADRAN, M. M. *In vitro* skin penetration and antimycotic activity of itraconazole loaded niosomes: Various non-ionic surfactants. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 28, p. 37-45, Aug. 2015.

AMRI, M. et al. *Aspergillus sclerotiorum*: à propos d'un cas d'onychomycose en Tunisie. **Journal of Medical Mycology**, v. 20, n. 2, p. 128-132, 2010.

ANBU, P. et al. Extracellular keratinase from *Trichophyton* sp. HA-2 isolated from feather dumping soil. **International & Biodeterioration and Biodegradation**, v. 62, n. 3, p. 287-292, 2008.

ARAIZA-SANTIBÁNEZ, J. et al. Onychomycosis in the elderly . A 2-year retrospective study of 138 cases. **Revista Médica del Hospital General de México**, v. 79, n. 1, p. 5-10, 2016.

ARAÚJO, L. A.; MAIA CAMPOS, P, M. B. G. Fisiologia e Importância das Unhas. **Cosmetics & Toiletries (Brasil)**, v. 25, p. 34-36, 2013.

BAILLY, S. et al. Impact of antifungal prescription on relative distribution and susceptibility of *Candida* spp.. – Trends over 10 years. **Journal of Infection**, v. 72, n. 1, p. 103-111, 2016.

BAPTISTA, E. B. et al. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Eucalyptus smithii* against dermatophytes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n 6, p. 746-752, 2015.

BARBOSA, M. L. et al. Uma lição de clínica médica através das unhas : lesões ungueais relacionadas a doenças sistêmicas. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 4, n. 1, p. 75-78, 2013.

BERNARDES, I. et al. *Aloe vera* extract reduces both growth and germ tube formation by *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 55, n. 3, p. 257-261, 2012.

BHATTA, A. K. et al. Fractional carbon-dioxide (CO<sub>2</sub>) laser-assisted topical therapy for the treatment of onychomycosis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 74, n. 5, p. 916-923, 2016.

- BHATTA, A. K.; KEYAL, U.; WANG, X. L. Photodynamic therapy for onychomycosis: A systematic review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 15, p. 228-235, 2016.
- BIASI-GARBIN, R. P. et al. Antifungal potential of plant species from brazilian caatinga against. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, n. 18, p. 1-5, 2016.
- BIESBROECK, L. K.; FLECKMAN, P. Nail disease for the primary care provider. **Medical Clinics of North America**, v. 99, n. 6, p. 1213-1226, 2015.
- BISHA, B.; KIM, H. J.; BREHM-STECHER, B. F. Improved DNA-FISH for cytometric detection of *Candida* spp.. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 4, p. 881-892, 2011.
- BIZERRA, F. C. et al. Changes in cell wall synthesis and ultrastructure during paradoxical growth effect of caspofungin on four different *Candida* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 302-310, 2011.
- BONDARYK, M.; KURZAŃKOWSKI, W.; STANISZEWSKA, M. Antifungal agents commonly used in the superficial and mucosal candidiasis treatment: mode of action and resistance development. **Postepy Dermatologii i Alergologii**, v. 30, n. 5, p. 293-301, 2013.
- BONIFAZ, A. et al. Comparison of direct microscopy, culture and calcofluor white for the diagnosis of onychomycosis. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 30, n. 2, p. 109-111, 2013.
- BORGES, A. C. et al. Cold atmospheric pressure plasma jet modulates *Candida albicans* virulence traits. **Clinical Plasma Medicine**, v. 7, n. 8, p. 9-15, 2017.
- BRASIL. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. Módulo 8: Detecção e identificação de fungos de importância médica. Brasília: Anvisa, 2013. 47 p.
- BREAR, K.; WALTERS, D.; ROBINS, D. Synthesis and antifungal activity of six benzylic diamines. **FEMS Microbiology Letters**, v. 157, n. 2, p. 291-294, 1997.
- BROOKS, G. F. et al. **Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. 25. ed. Porto Alegre: Ed. AMGH, 813 p., 2012.
- BUSCA, A.; TORTORANO, A. M.; PAGANO, L. Reviewing the importance and evolution of fungal infections and potential antifungal resistance in haematological patients. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 3, n. 4, p. 237-241, 2015.
- CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 327-335, 2001.

CAMPOS, M. R. M. et al. Stimulation, inhibition and death of macrophages infected with *Trichophyton rubrum*. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 2, p. 372-379, 2006.

CANESCHI, C. A. **Potencial Antifúngico do óleo essencial de *Baccharis trimera* Less (D.C.)**. 2013. 96 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

\_\_\_\_\_. et al. *In vitro* antifungal activity of *Baccharis trimera* Less (DC) essential oil against dermatophytes. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 11, p. 2083-2089, 2015.

\_\_\_\_\_. et al. *In vitro* antifungal activity of organic compounds derived from amino alcohols against onychomycosis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 476–482, 2017.

CASHMAN, M. W.; SLOAN, S. B. Nutrition and nail disease. **Clinics in Dermatology**, v. 28, n. 4, p. 420-425, 2010.

CHAFFIN, W. L. et al. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 1, p. 130-180, 1998.

CHAUVIN, M. F. Traitement des onychomycoses. **Revue francophone des laboratoires**, v. 2011, n. 432, p. 71–75, 2011.

CHEN, J. et al. Substrate adaptation of *Trichophyton rubrum* secreted endoproteases. **Microbial Pathogenesis**, v. 48, n. 2, p. 57–61, 2010.

CHERNOFF, K. A.; SCHER, R. K. Nail disorders: kids are not just little people. **Clinics in Dermatology**, v. 34, n. 6, p. 736-741, 2016.

CHU, D. H.; RUBIN, A. I. Diagnosis and management of nail disorders in children. **Pediatric Clinics of North America**, v. 61, n. 2, p. 293-308, 2014.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**; Approved Standard - Third Edition - CLSI document - M27-A3. v. 28, n. 14, 2008a.

\_\_\_\_\_. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**; Approved Standard - Second Edition - CLSI document - M27-S4, CLSI, Wayne, PA, USA, 2012.

\_\_\_\_\_. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi**; Approved Standard - Second Edition - CLSI document M38-A2, CLSI, Wayne, PA, USA, 2008b.

COIMBRA, E. S. et al. Synthesis and antileishmanial activity of lipidic amino alcohols. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 75, n. 2, p. 233-235, 2010.

CUNHA, M. M. L. et al. Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: a trap for oxidative radicals. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 80, p. 1-9, 2010.

CUNICO, W. et al. Synthesis and anti-mycobacterial activity of novel amino alcohol derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 974-978, 2011.

DA CUNHA, K.; FONTAO, L. Comparative study of PCR, microscopic examination and culture-based methods for detection and identification of fungi in onychomycosis. **Journal of Medical Mycology**, v. 26, n. 2, p. e22-e23, 2016.

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

DIEGO, A. M. de. Aspectos clínicos, diagnósticos y terapêuticos de las dermatofitosis. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 29, n. 3, p. 33-39, 2011.

DIOGO, H. C. et al. 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**, v. 85, n. 3, p. 324-330, 2010.

DROUOT, S. et al. Pets as the main source of two zoonotic species of the *Trichophyton mentagrophytes* complex in Switzerland, *Arthroderma vanbreuseghemii* and *Arthroderma benhamiae*. **Veterinary Dermatology**, v. 20, n. 1, p. 13-18, 2009.

ELEWSKI, B. E. et al. 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**, v. 73, n. 1, p. 62-69, 2015.

EL-HOSSARY, E. M. et al. Antifungal potential of marine natural products. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 126, n. 27, p. 631-651, 2017.

ELLEPOLA, A. N. B.; SAMARANAYAKE, L. P. The effect of brief exposure to sub-therapeutic concentrations of chlorhexidine gluconate on the germ tube formation of oral *Candida albicans* and its relationship to post-antifungal effect. **Oral Diseases**, v. 6, n. 3, p. 166-171, 2000.

ELSAYED, M. M. A. Development of topical therapeutics for management of onychomycosis and other nail disorders: a pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 199, n. 10, p. 132-144, 2015.

EMAM, S. M.; EL-SALAM, O. H. A. Real-time PCR: A rapid and sensitive method for diagnosis of dermatophyte induced onychomycosis, a comparative study. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 52, n. 1, p. 1-8, 2016.

- ESPINEL-INGROFF, A. et al. Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for *Aspergillus* spp.: NCCLS collaborative study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 9, p. 3204-3208, 2002.
- FALCI, D. R.; PASQUALOTTO, A. C. Anfotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade. **Clinical and Biomedical Research**, v. 35, n. 2, p. 65-82, 2015.
- FALAHATI, M. et al. Comparison of antifungal effect of nanosilver particles alone and in combination with current drugs on *Candida* species isolated from women with recurrent vulvovaginal candidiasis. **European Journal of Experimental Biology**, v. 4, n. 1, p. 77-82, 2014.
- FEKRAZAD, R. et al. Eradication of *C. albicans* and *T. rubrum* with photoactivated indocyanine green, *Citrus aurantifolia* essential oil and fluconazole. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, n. 2, p. 289-297, 2015.
- FELDSTEIN, S.; TOTRI, C.; FRIEDLANDER, S. F. Antifungal therapy for onychomycosis in children. **Clinics in Dermatology**, v. 33, n. 3, p. 333-339, 2015.
- FLICK, A. C. et al. Synthetic approaches to the 2014 new drugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 9, p. 1937-1980, 2016.
- FUENTES, M. et al. Actividad antifúngica de melanina en cepas clínicas de *Candida* spp.. **Revista Chilena de Infectología**, v. 31, n. 1, p. 28-33, 2014.
- GATICA, J. L. et al. Onicomycosis: comparación de tres métodos diagnósticos en pacientes del Archipiélago Juan Fernández. **Piel**, v. 32, n. 3, p. 126–131 , 2017.
- GHANNOUM, M. et al. *In vitro* antifungal activity of naftifine hydrochloride against dermatophytes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 9, p. 4369-4372, 2013.
- GIORDANI, R. B. et al. Anti-protozoal activity of diamine derivatives. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 65, n. 1, p. 60-62, 2011.
- \_\_\_\_\_ et al. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of synthetic lipophilic diamine and amino alcohol derivatives. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 63, n. 8, p. 613-617, 2009.
- GIUDICE, M. C. **Avaliação das atividades enzimáticas (queratinase e elastase) e biotipagem molecular de amostras de *Microsporium gypseum* isolados de diferentes fontes e regiões geográficas do Brasil**. 2008. 109 f. Tese (Doutorado em Ciências – Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

\_\_\_\_\_ et al. Isolation of *Microsporium gypseum* in soil samples from different geographical regions of Brazil, evaluation of the extracellular proteolytic enzymes activities (keratinase and elastase) and molecular sequencing of selected strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 895-902, 2012.

GORDON, A. K et al. Clinical application of a molecular assay for the detection of dermatophytosis and a novel non-invasive sampling technique. **Pathology**, v. 48, n. 7, p. 720-726, 2016.

GREGORY, N. Special patient populations: onychomycosis in the HIV-positive patient. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 35, n. 3, p. S13-S16, 1996.

GUÉHO, E.; CASTRO, I.; BADILLET, G. Existence of ornamentations on macroconidia and hyphae of *Epidermophyton floccosum*. **Annales de l'Institut Pasteur. Microbiology**, v. 136 B, n. 2, p. 195–207, 1985.

GUIRAO-ABAD, J. P. et al. ROS formation is a differential contributory factor to the fungicidal action of amphotericin B and micafungin in *Candida albicans*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 307, n. 4–5, p. 241–248 , 2017.

GUNTANG, W. et al. Prevalence and virulence factors of *Candida* spp. associated with blow flies. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 5, p. 428–431 , 2017.

GUPTA, A. K.; DAIGLE, D.; CARVIEL, J. L. The role of biofilms in onychomycosis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 74, n. 6, p. 1241–1246, 2016.

\_\_\_\_\_; PAQUET, M.; SIMPSON, F. C. Therapies for the treatment of onychomycosis. **Clinics in Dermatology**, v. 31, n. 5, p. 544–554, 2013.

GUPTA, A.; KAR, H. K. Antidermatophytic activity of miconazole nanoformulation against *Trichophyton rubrum*. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 9, p. 707-710, 2015.

HAJAR, T. et al. Modified PAS stain: A new diagnostic method for onychomycosis and tinea. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 33, n. 1, p. 34-37, 2016.

HAMID, S. et al. Deterrence in metabolic and biofilms forming activity of *Candida* species by mycogenic silver nanoparticles. **Journal of Applied Biomedicine journal**, v. 15, n. 4, p. 249-255 , 2017.

HARDING, M. W. et al. Can filamentous fungi form biofilms? **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 11, p. 475-480, 2009.

HAY, R. J.; BARAN, R. Onychomycosis: A proposed revision of the clinical classification. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 65, n. 6, p. 1219-1227, 2011.

HJIRA, N. et al. Von Zumbusch ' s pustular psoriasis associated with oral terbinafine. **Journal of Dermatology & Dermatologic Surgery**, no prelo, p. 4–7, 2017.

HUBE, B. et al. Dermatomycoses and inflammation: The adaptive balance between growth, damage, and survival. **Journal of Medical Mycology**, v. 25, n. 1, p. e44-e58, 2015.

HWANG, J. Y. et al. Synthesis and evaluation of hexahydropyrimidines and diamines as novel hepatitis C virus inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 70, p. 315-325, 2013.

IBRAHIM, A. S. et al. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 5, p. 1993-1998, 1995.

IBRAHIM, N. H. et al. The effect of antifungal combination on transcripts of a subset of drug-resistance genes in clinical isolates of *Candida* species induced biofilms. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 1, p. 55-66, 2015.

IMBERT, J. L. et al. Onicomicosis por levaduras no comunes en diabéticos de un centro de salud. **SEMERGEN - Medicina de Familia**, v. 42, n. 7, p. 449-457, 2016.

INOUE, S. et al. The activity of oregano, perilla, tea tree, lavender, clove, and *Geranium* oils against a *Trichophyton mentagrophytes* in a closed box. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 12, n. 6, p. 349-354, 2006.

IORIZZO, M. Tips to treat the 5 most common nail disorders: brittle nails, onycholysis, paronychia, psoriasis, onychomycosis. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 2, p. 175-183, 2015.

ISHIDA, K. et al. Negative correlation between phospholipase and esterase activity produced by *Fusarium* isolates. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 5, p. 411-416, 2012.

ITOI, S. et al. *In vitro* activities of antifungal agents against clinical isolates of dermatophytes from animals. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 74, n. 8, p. 1067-1069, 2012.

JACOBSON, E. S. Pathogenic roles for fungal melanins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 708-717, 2000.

JO SIU, W. J. et al. Comparison of *in vitro* antifungal activities of efinaconazole and currently available antifungal agents against a variety of pathogenic fungi associated with onychomycosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1610-1616, 2013.

KADIR, T.; GÜMRÜ, B.; UYGUN-CAN, B. Phospholipase activity of *Candida albicans* isolates from patients with denture stomatitis: The influence of chlorhexidine gluconate on phospholipase production. **Archives of Oral Biology**, v. 52, n. 7, p. 691-696, 2007.

KAJISHIMA, A. K. **Estudo da biogênese dos melanossomas e o controle da síntese da melanina pelo inibidor triclazol nos fungos demáceos *Fonsecaea pedrosoi* e *Wangiella dermatidis***. 2009. 31 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, 2009.

KANDA, N. et al. Immunobiology The antimycotic drugs itraconazole and terbinafine hydrochloride induce the production of human beta -defensin-3 in human keratinocytes. **Immunobiology**, v. 216, n. 4, p. 497–504, 2011.

KATHIRAVAN, M. K. et al. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 19, p. 5678-5698, 2012.

KERAI, L. V. et al. UV-curable gels as topical nail medicines: *In vivo* residence, anti-fungal efficacy and influence of gel components on their properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 514, n. 1, p. 244-254, 2016.

KHAN, M. S. A.; AHMAD, I. Antifungal activity of essential oils and their synergy with fluconazole against drug-resistant strains of *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 3, p. 1083-1094, 2011.

KHOSRAVI, R. A. et al. Antimycotic efficacy of Iranian medicinal plants towards dermatophytes obtained from patients with dermatophytosis. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 11, n. 1, p. 43-48, 2013.

KIKI-BARRO, P. C. M. et al. Mycological profile of hand onychomycosis amongs “Garba” sellers in Abidjan (Côte d’Ivoire). **Journal de Mycologie Medicale**, v. 17, p. 6–11, 2017.

KOBAN, I. et al. Treatment of *Candida albicans* biofilms with low-temperature plasma induced by dielectric barrier discharge and atmospheric pressure plasma jet. **New Journal of Physics**, v. 12, n. 7, p. 730-739, 2010.

KOKIL, G. R. et al. Synthesis and *in vitro* evaluation of novel 1, 2, 4-triazole derivatives as antifungal agents. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 7, n. 1, p. 46-49, 2010.

KOMOTO, T. T. et al. Gene expression response of *Trichophyton rubrum* during coculture on keratinocytes exposed to antifungal agents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-7, 2015.

KOZAREV, J.; VIZINTIN, Z. Novel laser therapy in treatment of onychomycosis. **Journal of the Laser and Health Academy**, v. 2010, n. 1, p. 1-8, 2010.

KRAUSS, J. et al. Synthesis and biological evaluation of novel N-alkyl tetra- and decahydroisoquinolines: Novel antifungals that target ergosterol biosynthesis. **Archiv der Pharmazie**, v. 347, n. 4, p. 283-290, 2014.

KUMAR, R.; SHUKLA, P. K. Amphotericin B resistance leads to enhanced proteinase and phospholipase activity and reduced germ tube formation in *Candida albicans*. **Fungal Biology**, v. 114, n. 2-3, p. 189-197, 2010.

KUNG, D. W. et al. Discovery of spirocyclic-diamine inhibitors of mammalian acetyl CoA-carboxylase. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 22, p. 5352-5356, 2015.

LAFFLEUR, F.; ATALL, M. Preparation and evaluation of a novel dosage form for onychomycosis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 518, n. 1-2, p. 105-110, 2017.

LARONE, D. H. **Medically important fungi, a guide to identification**. 3. ed. EUA: ASM press, 274 p., 1995.

LEMSADDEK, A. **Estudo de dermatófitos por métodos moleculares: identificação, resistência a antifúngicos e virulência**. 2008. 218 f. Tese (Doutorado em Biologia: Microbiologia) – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2008.

LINDSLEY, M. D. et al. Rapid identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific DNA probes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p. 3505-3511, 2001.

LÓPEZ-CHICÓN, P. et al. Terapia fotodinámica antimicrobiana in vitro aplicada sobre *Trichophyton mentagrophytes* con nuevo azul de metileno como fotosensibilizador. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 107, n. 9, p. 765-770, 2016.

LUSIANA; S. R.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Infected nail plate model made of human hair keratin for evaluating the efficacy of different topical antifungal formulations against *Trichophyton rubrum* in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 84, n. 3, p. 599-605, 2013.

MADDY, A. J.; TOSTI, A. Hair and Nail Diseases in the Mature Patient. **Clinics in Dermatology**, v. 3, 2017.

MAGAGNIN, C. M. et al. Perfil de suscetibilidade a antifúngicos de dermatófitos isolados de pacientes com insuficiência renal crônica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 694-701, 2011.

MAHBOUBI, M.; KAZEMPOUR, N. The antifungal activity of *Artemisia sieberi* essential oil from different localities of Iran against dermatophyte fungi. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 25, n. 2, p. e65-e71, 2015.

MAHMOUDABADI, A. Z.; ZARRIN, M.; MIRY, S. Phospholipase activity of *Candida albicans* isolated from vagina and urine samples. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 169-173, 2010.

MARTINELLI, P. R. P.; SANTOS, J. M. dos Microscopia eletrônica de varredura de fungos nematófagos associados a *Tylenchulus semipenetrans* e *Pratylenchus jaehni*. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 5, p. 809-816, 2010.

MARTÍNEZ, E. et al. *Microsporum* spp.. onychomycosis: Disease presentation, risk factors and treatment responses in an urban population. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 18, n. 2, p. 181-186, 2014.

MARTINS, N. et al. Susceptibility testing of *Candida albicans* and *Candida glabrata* to *Glycyrrhiza glabra* L. **Industrial Crops & Products**, v. 108, p. 480–484, 2017.

MARTINS, F. J. **Atividade antifúngica de compostos derivados do ácido cinâmico no tratamento da onicomicoses**. 2016. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2016.

MATOS, R. F. **Atividade antifúngica da nimesulida isolada ou em associação com a terbinafina contra fungos dermatófitos e seu provável mecanismo de ação *in vitro***. 2015. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas: Fármacos e Medicamentos) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2015.

MATTEI, A. S. et al. Determination of germ tube , phospholipase , and proteinase production by bloodstream isolates of *Candida albicans*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 3, p. 340-342, 2013.

MAURYA, I. K. et al. Antifungal activity of novel synthetic peptides by accumulation of reactive oxygen species (ROS) and disruption of cell wall against *Candida albicans*. **Peptides**, v. 32, n. 8, p. 1732-1740, 2011.

MCAULEY, W. J. et al. An investigation of how fungal infection influences drug penetration through onychomycosis patient's nail plates. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 102, p. 178-184, 2016.

MCCARTHY, D. J. Origins of onychomycosis. **Clinics in Podiatric Medicine and Surgery**, v. 21, n. 4, p. 533-553, 2004.

MCCARTY, T. P.; PAPPAS, P. G. Invasive Candidiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 103–124 , 2016.

- MÉNDEZ-TOVAR, L. J. et al. Resistencia a compuestos azólicos de aislamientos clínicos de *Trichophyton* spp.. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 24, n. 4, p. 320-322, 2007.
- METIN, A.; DILEK, N.; DEMIRSEVEN, D. D. Fungal infections of the folds (intertriginous areas). **Clinics in Dermatology**, v. 33, n. 4, p. 437-447, 2015.
- MIO, L. L. M-D.; NOVAES, Q. S. de; ALVES, E. Metodologias de preparação de amostras de ferrugem para estudos morfológicos de urediniósporos por meio de microscopia eletrônica de varredura. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 3, p. 267-273, 2006.
- MONOD, M. et al. Secreted proteases from pathogenic fungi. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 292, n. 5-6, p. 405-419, 2002.
- MONTEIRO, D. R. et al. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms to silver nanoparticles in intermediate and mature development phases. **Journal of Prosthodontic Research**, v. 59, n. 1, p. 42–48, 2015.
- MORACE, G.; PERDONI, F.; BORGHI, E. Antifungal drug resistance in *Candida* species. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 2, n. 4, p. 254-259, 2014.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MOUBASHER, A. H.; ABDEL-SATER, M. A.; SOLIMAN, Z. Incidence and biodiversity of yeasts, dermatophytes and non-dermatophytes in superficial skin infections in Assiut, Egypt. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 27, n. 2, p. 166–179, 2017.
- MOYANO, E. G.; ERCHIGA, V. C.; PILAR, L. M. Dermatofitosis. **Piel. Formação continuada em dermatologia**, v. 31, n. 8, p. 546-559, 2016.
- MUHSIN, T. M.; AUBAID, A. H.; AL-DUBOON, A. H. Extracellular enzyme activities of dermatophytes and yeast isolates on solid media. **Mycoses**, v. 40, n. 11-12, p. 465-469, 1997.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Partial purification and some biochemical characteristics of exocellular keratinase from *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei*. **Mycopathologia**, v. 150, n. 3, p. 121-125, 2000.
- MUJAHID, M. et al. Synthesis and antitubercular activity of amino alcohol fused spirochromone conjugates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 5, p. 1416-1419, 2013.
- MURDAN, S. Drug delivery to the nail following topical application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 236, n. 1-2, p. 1-26, 2002.

\_\_\_\_\_. Nail disorders in older people, and aspects of their pharmaceutical treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 30, n. 2, p. 405-411, 2016.

NETT, J. E.; ANDES, D. R. Antifungal agents: spectrum of activity, pharmacology, and clinical indications. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 51-83, 2016.

OLIVEIRA, E. E. de et al. Toxinas killer e produção de enzimas por *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com câncer. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 6, p. 523-527, 1998.

OLIVEIRA, S. R. **Síntese e estudo das atividades antifúngica e antitumoral de derivados acíclicos e furânicos  $\alpha$ ,  $\omega$ -bis-funcionalizados**. 2012. 129 f. Tese (Doutorado em Ciências-Química) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012a.

OLIVEIRA, V. M. **Associação entre *Camellia sinensis* e anfotericina b: atividade antifúngica e citotoxicidade**. 2012. 79 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, Guarapuava, 2012b.

OLIVEIRA, S. B. B. de. **Perfil de suscetibilidade antifúngica e fatores de virulência de leveduras isoladas de onicomicoses de pacientes atendidos no Laboratório central do Estado do Pará (LACEN)**. 2014. 57 f. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia Celular) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2014.

OTA, M. Pseudo-onychomycosis. **The Lancet Infectious Diseases** v. 17, n. 2, p. 235, 2017.

OUF, S. A. et al. Anti-fungal potential of ozone against some dermatophytes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 697-702, 2016.

OYARZO, P. V.; CHOAPPA, R. C. Onicomicosis por levaduras: agentes y estudio de sensibilidad en la región de Valparaíso, Chile. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 32, n. 2, p. 132-133, 2015.

OYEKA, C. A. *Trichophyton mentagrophytes* a keratinophilic fungus. In: KUSHWAHA, R. K. S.; GUARRO, J. (Eds.). **Biology of Dermatophytes and other Keratinophilic Fungi**. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología, Chapter 8, p. 60-65, 2000

PAKSHIR, K. et al. Phospholipase, esterase and hemolytic activities of *Candida* spp.. isolated from onychomycosis and oral lichen planus lesions. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 23, n. 2, p. 113-118, 2013.

- PANNU, J. et al. NB-002, a novel nanoemulsion with broad antifungal activity against dermatophytes, other filamentous fungi, and *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 8, p. 3273-3279, 2009.
- PARK, M. J. et al. Effect of citral, eugenol, nerolidol and  $\alpha$ -terpineol on the ultrastructural changes of *Trichophyton mentagrophytes*. **Fitoterapia**, v. 80, n. 5, p. 290-296, 2009.
- PASKIABI, F. A. et al. Terbinafine-loaded wound dressing for chronic superficial fungal infections. **Materials Science and Engineering C**, v. 73, p. 130-136, 2017.
- PATEL, M.; GULUBE, Z.; DUTTON, M. The effect of *Dodonaea viscosa* var. *angustifolia* on *Candida albicans* proteinase and phospholipase production and adherence to oral epithelial cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, n. 3, p. 562-565, 2009.
- PELEGRINI, A. et al. Incidence of dermatophytosis in a public hospital of São Bernardo do Campo, São Paulo State, Brazil. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 26, n. 2, p. 118-120, 2009.
- PEREIRA, C. A. et al. 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' mouths and nipples. **Mycopathologia**, v. 171, n. 2, p. 103-109, 2011.
- PEREIRA, F. O. **Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor sobre dermatófitos do gênero *Trichophyton***. 2009. 119 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia – Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.
- PEREIRA, F. de O.; MENDES, J. M.; LIMA, E. de O. Investigation on mechanism of antifungal activity of eugenol against *Trichophyton rubrum*. **Medical Mycology**, v. 51, n. 5, p. 507-513, 2013.
- PERES, N. T. et al. Dermatófitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 5, p. 657-667, 2010a.
- PERES, N. T. A. et al. Transcriptional profiling reveals the expression of novel genes in response to various stimuli in the human dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 39, p. 1-10, 2010b.
- PERLIN, D. S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. The global problem of antifungal resistance: Prevalence, mechanisms, and management. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3099, n. 17, p. 1–10, 2017.

PERSINOTI, G. F. Análise do perfil transcricional do dermatófito *Trichophyton rubrum* durante a interação com o agente inibidor acriflavina. 2012. 114 f. Tese (Doutorado em Ciências – Genética) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

POLAK-WYSS, A. Mechanism of action of antifungals and combination therapy. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 4, p. S11-S16, 1995.

POZZATTI, P. et al. Activities of essential oils in the inhibition of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* germ tube formation. **Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology**, v. 20, n. 3, p. 185-189, 2010.

PRIYANKA et al. Synthesis, antimicrobial, cytotoxic and *E. coli* DNA gyrase inhibitory activities of coumarinyl amino alcohols. **Bioorganic Chemistry**, v. 71, p. 120-127, 2017.

PURIM, K. S. M. **Pele e esporte : infecções fúngicas cutâneas podais no futebol**. 2006. 136 f. Tese (Doutorado em Medicina Interna) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

\_\_\_\_\_ et al. Aspectos epidemiológicos das micoses dos pés em um time chinês de futebol. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 12, n. 1, p. 16-20, 2006.

RAJPUT, S. B.; KARUPPAYIL, S. M. Beta-Asarone, an active principle of *Acorus calamus* rhizome, inhibits morphogenesis, biofilm formation and ergosterol biosynthesis in *Candida albicans*. **Phytomedicine**, v. 20, n. 2, p. 139-142, 2013.

RAMOS, L. de S. et al. Protease and phospholipase activities of *Candida* spp. isolated from cutaneous candidiasis. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 32, n. 2, p. 122-1254, 2015.

RANG, H. P. et al. **Rang & Dale Farmacologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier, 2007.

RASHID, A; SCOTT, E. M.; RICHARDSON, M. D. Inhibitory effect of terbinafine on the invasion of nails by *Trichophyton mentagrophytes*. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 33, n. 5, p. 718-723, 1995.

REEDY, J. L.; BASTIDAS, R. J.; HEITMAN, J. The Virulence of human pathogenic fungi: notes from the south of France. **Cell Host and Microbe**, v. 2, n. 2, p. 77-83, 2007.

REZENDE JR, C. O. et al. Synthesis and antibacterial activity of alkylated diamines and amphiphilic amides of quinic acid derivatives. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 86, n. 3, p. 344-350, 2015.

REZENDE JR, C. O. R. et al. Preparation and antitubercular activity of lipophilic diamines and amino alcohols. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 5, p. 703-705, 2009

RICETO, E. B. de M. et al. Enzymatic and hemolytic activity in different *Candida* species. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 32, n. 2, p. 79-82, 2014.

RIFFEL, A. **Avaliação de proteases extracelulares da cepa *Chryseobacterium* sp. Kr6 e purificação e caracterização de uma metaloprotease queratinolítica**. 98 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Microbiologia Agrícola) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

RIVAS, L.; MÜHLHAUSER, M. Complejo *Trichophyton mentagrophytes*. **Revista Chilena de Infectologia**, v. 32, n. 3, p. 319-320, 2015.

ROBERTS, D. T.; TAYLOR, W. D.; BOYLE, J. Guidelines for treatment of onychomycosis. **British Journal of Dermatology**, v. 148, n. 3, p. 402-410, 2003.

ROBRES, P. et al. Utilidad de la terapia fotodinámica en el manejo de la onicomicosis. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 106, n. 10, p. 795-805, 2015.

ROCHA, K. A. D. et al. Voriconazole-loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for drug delivery in deeper regions of the nail plate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 531, n. 1, p. 292–298, 2017.

ROMERO-CERECERO, O. et al. Clinical trial to compare the effectiveness of two concentrations of the *Ageratina pichinchensis* extract in the topical treatment of onychomycosis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, n. 1, p. 74-78, 2009.

ROY, P.; BHATT, P. *Nattrassia mangiferae*: An uncommon agent of onychomycosis. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 71, n. 3, p. 297-299, 2015.

SACHIN, C. D.; RUCHI, K.; SANTOSH, S. *In vitro* evaluation of proteinase, phospholipase and haemolysin activities of *Candida* species isolated from clinical specimens. **International Journal of Medicine and Biomedical Research**, v. 1, n. 2, p. 153-157, 2012.

SAI DEVI, T. et al. A study on anti dermatophytic potential of selected ethno medicinal plants against *Trichophyton rubrum*, a common etiologic agent in and around Visakhapatnam region (India). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 3, p. S1874-S1878, 2012.

SALES JR, P. A. et al. The in vitro activity of fatty diamines and amino alcohols against mixed amastigote and trypomastigote *Trypanosoma cruzi* forms. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 3, p. 362-364, 2014.

SANCHES, T. P. **Estudo sobre determinação de elementos químicos em unhas humanas pelo método de análise por ativação com nêutrons**. 2012. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Tecnologia Nuclear: Aplicações) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2012.

SANYAL, A. K.; DAS, S. K.; BANERJEE, A. B. Purification and characterization of a major extracellular proteinase from *Trichophyton rubrum*. **Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 23, p.165-178, 1985.

SCHREIER, S.; MALHEIROS, S. V. P.; PAULA, E. de Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects. **Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1508, n. 23, p. 210-234, 2000.

SHAH, J. J. et al. et al. Design, synthesis and evaluation of benzotriazole derivatives as novel antifungal agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 17, p. 3730-3737, 2015.

SHAH, S. R.; DALAL, B. D.; MODAK, M. S. Nondermatophytic onychomycosis by *Fusarium oxysporum* in an immunocompetent host. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 26, n. 1, p. e18-e21, 2016.

SHARMA, M. et al. Synthesis, antimicrobial activity and structure-activity relationship study of N,N-dibenzyl-cyclohexane-1,2-diamine derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 2, p. 480-487, 2011.

SHARMA, R.; SHARMA, M. Keratinase activity of dermatophytes and yeast species for poultry waste and waste water treatment. **The IIOAB Journal**, v. 2, n. 3, p. 19-22, 2011.

SHREAZ, S. et al. Influences of cinnamic aldehydes on H<sup>+</sup> extrusion activity and ultrastructure of *Candida*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62 (pt. 2) p. 232-240, 2013.

SILVA, A. L. N. et al. *In vitro* leishmanicidal activity of N-dodecyl-1,2-ethanediamine. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 66, n. 3, p. 180-186, 2012.

SILVEIRA, H. C. S. **A capacidade de infecção do dermatófito *Trichophyton rubrum* está correlacionada com a sinalização do pH extracelular**. 2007. 121 p. Tese (Doutorado em Ciências – Genética) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

SIMIC, M. et al. Functionalised isocoumarins as antifungal compounds: synthesis and biological studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 1, p. 235-239, 2016.

SLEVEN, R. et al. Development of a novel *in vitro* onychomycosis model for the evaluation of topical antifungal activity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 112, p. 73-75, 2015.

SOLTANI, M. et al. A study of onychomycosis in patients attending a dermatology center in Tehran, Iran. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 25, n. 2, p. e81-e87, 2015.

SORRELL, T. C. et al. Fungal phospholipid metabolism for antifungal drug discovery. **Microbiology Australia**, p. 93-94, 2010.

SOUZA FERNANDES, F. de et al. Anthelmintic effects of alkylated diamines and amino alcohols against *Schistosoma mansoni*. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

\_\_\_\_\_ et al. Synthesis and evaluation of antibacterial and antitumor activities of new galactopyranosylated amino alcohols. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 108, p. 203–210, 2016.

SUN, W. et al. Strong synergism of dexamethasone in combination with fluconazole against resistant *Candida albicans* mediated by inhibiting drug efflux and reducing virulence. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 50, n. 3, p. 399–405, 2017

SZCZEPANIAK, J. et al. Blocking and dislocation of *Candida albicans* Cdr1p transporter by styrylquinolines. **International Journal of Antimicrobial Agents** v. 50, n. 2, p. 171–176, 2017.

TANG, G-M.; WANG, Y.-T. Two Voriconazole salts: Syntheses, crystal structures, solubility and bioactivities. **Journal of Molecular Structure**, v. 1152, p. 287–293, 2018.

TANG, H. et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel non-azole derivatives as potential antifungal agents. **Chinese Chemical Letters**, v. 26, n. 9, p. 1161-1164, 2015.

TARDIVO, J. P.; WAINWRIGHT, M.; BAPTISTA, M. Small scale trial of photodynamic treatment of onychomycosis in São Paulo. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 150, p. 66-68, 2015.

TATSUMI, Y. et al. Mechanism of action of efinaconazole, a novel triazole antifungal agent. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 2405-2409, 2013.

TAVEIRA, A. F. et al. Preparation and antitubercular activities of alkylated amino alcohols and their glycosylated derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 24, p. 7789-7794, 2007.

TEIXEIRA, P. A. C. et al. L-DOPA accessibility in culture medium increases melanin expression and virulence of *Sporothrix schenckii* yeast cells. **Medical Mycology**, v. 48, n. 5, p. 687-695, 2010.

TOBUDIC, S. et al. *In vitro* activity of antifungal combinations against *Candida albicans* biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 2, p. 271-274, 2009.

TOREY, A. et al. Exploration of the anticandidal mechanism of *Cassia spectabilis* in debilitating candidiasis. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 6, n. 1, p. 97-104, 2016.

TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 6 ed. São Paulo: Atheneu; 912 p., 2015.

TSANG, C. S. et al. Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 *diabetes mellitus*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 10, p. 1393-1398, 2007.

TSUBOI, R. et al. Isolation of a keratinolytic proteinase from *Trichophyton mentagrophytes* with enzymatic activity at acidic pH. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 11, p. 3479-3483, 1989.

TUCKER, J. R. J. Nail deformities and injuries. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 42, n. 4, p. 677-691, 2015.

URIBE, C. C. et al. Cytotoxic effect of Amphotericin B in a myofibroblast cell line. **Toxicology in vitro**, v. 27, n. 7, p. 2105-2109, 2013.

VALDES, B. S. G. et al. New polyurethane nail lacquers for the delivery of terbinafine – formulation and antifungal activity evaluation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 106, n. 6, p. 1570-1577, 2017.

VANGURU, S. et al. A novel piperazine linked  $\beta$ -amino alcohols bearing a benzosuberone scaffolds as anti-proliferative agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 4, p. 792-796, 2017.

VEJNOVIC, I.; SIMMLER, L.; BETZ, G. Investigation of different formulations for drug delivery through the nail plate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 386, n. 1-2, p. 185-194, 2010.

VIANI, F. C. et al. Production of extracellular enzymes by *Microsporium canis* and their role in its virulence. **Medical Mycology**, v. 39, n. 5, p. 463-468, 2001.

VIDOTTO, V. et al. Correlation between germ tube production, phospholipase activity and serotype distribution in *Candida albicans*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 16, n. 4, p. 208-210, 1999.

VIJAY, R.; ANGAYARKANNY, S.; BASKAR, G. Amphiphilic dodecyl ester derivatives from aromatic amino acids: Significance of chemical architecture in interfacial adsorption characteristics. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 317, n. 1-3, p. 643-649, 2008.

VILA, T. V.; ROZENTAL, S.; SÁ GUIMARÃES, C. M. de A new model of *in vitro* fungal biofilms formed on human nail fragments allows reliable testing of laser and light therapies against onychomycosis. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 3, p. 1031-1039, 2015.

WANG, W. et al. Novel carbazole aminoalcohols as inhibitors of b-hematin formation: Antiplasmodial and antischistosomal activities. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 7, n. 2, p. 191-199, 2017.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R. C. The dermatophytes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 2, p. 240-259, 1995.

WELSH, O.; VERA-CABRERA, L.; WELSH, E. Onychomycosis. **Clinics in Dermatology**, v. 28, n. 2, p. 151-159, 2010.

WESTERBERG, D. P.; VOYACK, M. J. Onychomycosis: current trends in diagnosis and treatment. **American Family Physician**, v. 88, n. 11, p.762-770, 2013.

WISSELINK, G. J.; ZANTEN, E. V.; KOOISTRA-SMID, A. M. Trapped in keratin; a comparison of dermatophyte detection in nail, skin and hair samples directly from clinical samples using culture and real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 85, n. 1, p. 62-66, 2011.

YAMANAKA, C. N. et al. Assessment of leishmanicidal and trypanocidal activities of aliphatic diamine derivatives. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 82, n. 6, p. 697-704, 2013.

YI, D-H. et al. Linear correlation of aliphatic diamines to response factors by number of carbons in GC–MS. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 30, p. 322-327, 2015.

YOUNGCHIM, S. et al. Melanogenesis in dermatophyte species in vitro and during infection. **Microbiology**, v. 157, n. 8, p. 2348-2356, 2011.

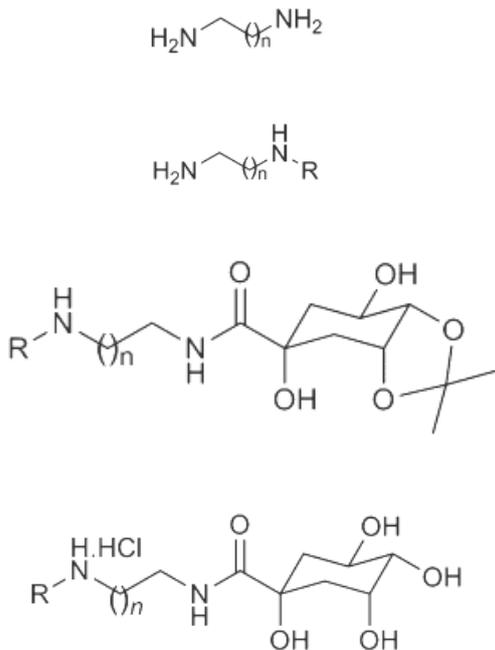
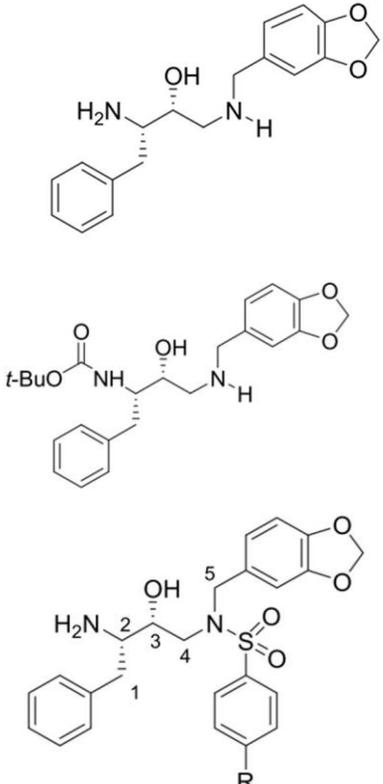
YU, X. et al. Melanin is required for the formation of the multi-cellular conidia in the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*. **Microbiological Research**, v. 179, p. 1-11, 2015.

ZALACAIN, A. et al. Podiatry care and amorolfine: An effective treatment of foot distal onychomycosis. **The Foot**, v. 16, n. 3, p. 149-152, 2006.

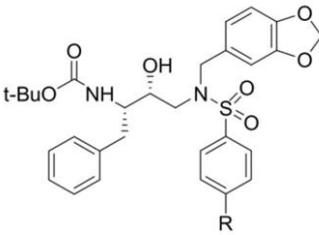
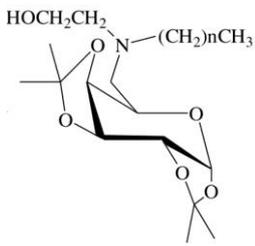
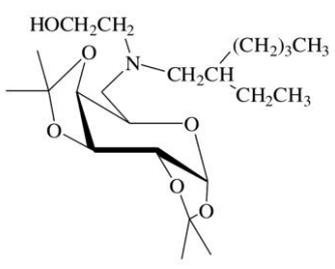
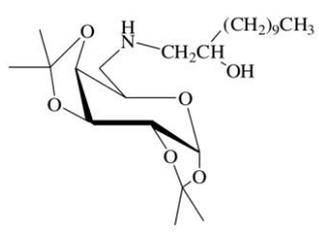
ZIMMERMAM-FRANCO, D. C. et al. Antifungal activity of *Copaifera langsdorffii* desf oleoresin against dermatophytes. **Molecules**, v. 18, n. 10, p. 12561–12570, 2013.

## APÊNDICE A

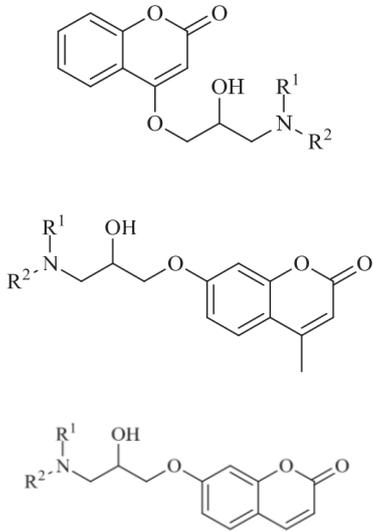
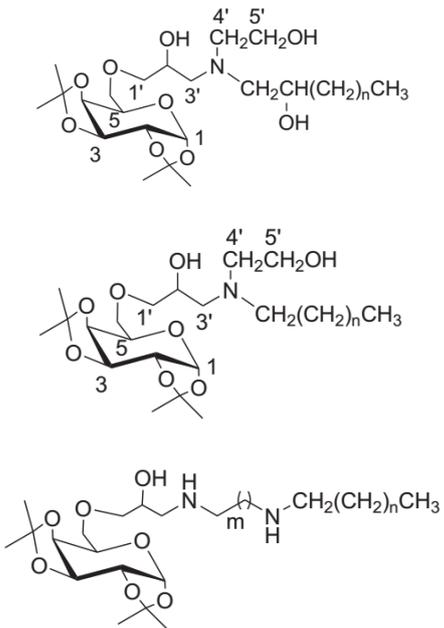
Amino álcoois e diaminas com ação antimicrobiana descrita.

Núcleo principal das moléculas	Ação biológica	
	Agente patológico	Descritor
	<p><i>Mycobacterium tuberculosis</i></p>	<p>(REZENDE JR et al., 2009)</p>
	<p><i>M. tuberculosis</i></p>	<p>(CUNICO et al., 2011)</p>

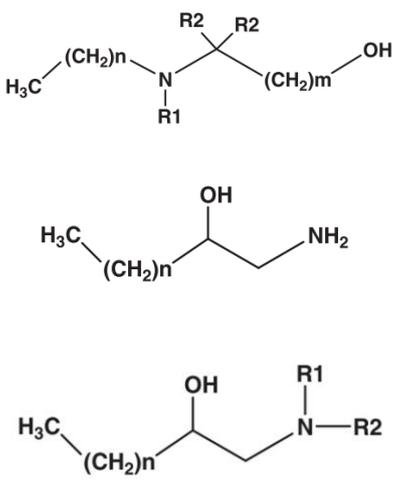
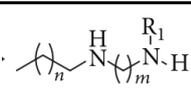
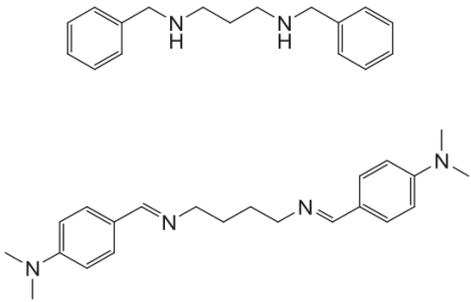
Amino álcoois e diaminas com ação antimicrobiana descrita.

Núcleo principal das moléculas	Ação biológica	
	Agente patológico	Descritor
	<i>M. tuberculosis</i>	(CUNICO et al., 2011)
<p> <math>\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}</math>  <math>\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\underset{\text{CH}_2\text{CH}_3}{\text{CH}}\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}</math>  <math>\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\underset{\text{OH}}{\text{CH}}\text{CH}_2\text{NH}_2</math> </p>   	<i>M. tuberculosis</i>	(TAVEIRA et al., 2007)

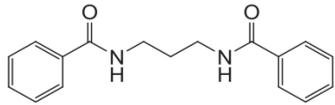
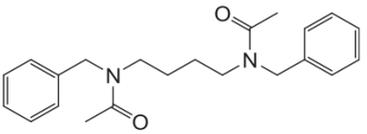
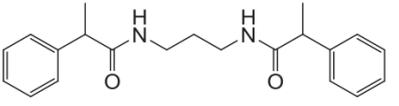
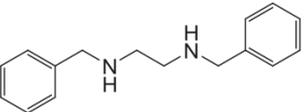
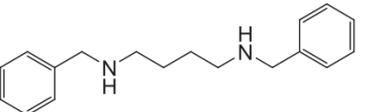
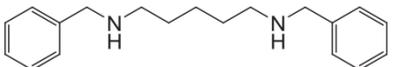
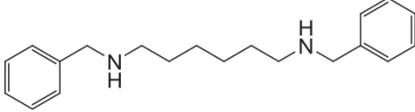
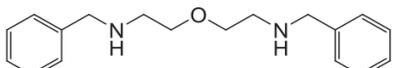
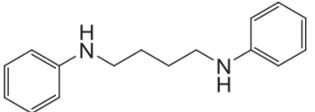
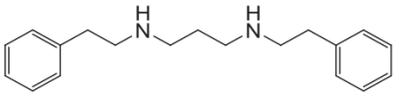
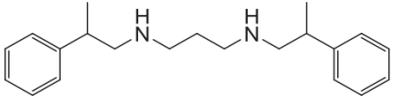
Amino álcoois e diaminas com ação antimicrobiana descrita.

Núcleo principal das moléculas	Ação biológica	
	Agente patológico	Descritor
	<p><i>Staphylococcus aureus</i>;  <i>Escherichia coli</i>;  <i>Pseudomonas aeruginosa</i>;  <i>P. vulgaris</i>.</p>	<p>(PRIYANA et al., 2017)</p>
<p><math>\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}</math></p> <p><math>\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CHOHCH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}</math></p> <p><math>\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{NH}_2</math></p> 	<p><i>M. tuberculosis</i>  <i>S. aureus</i>;  <i>E. coli</i>;  <i>P. aeruginosa</i>;  <i>S. epidermidis</i>.</p>	<p>(SOUZA FERNANDES et al., 2016)</p>

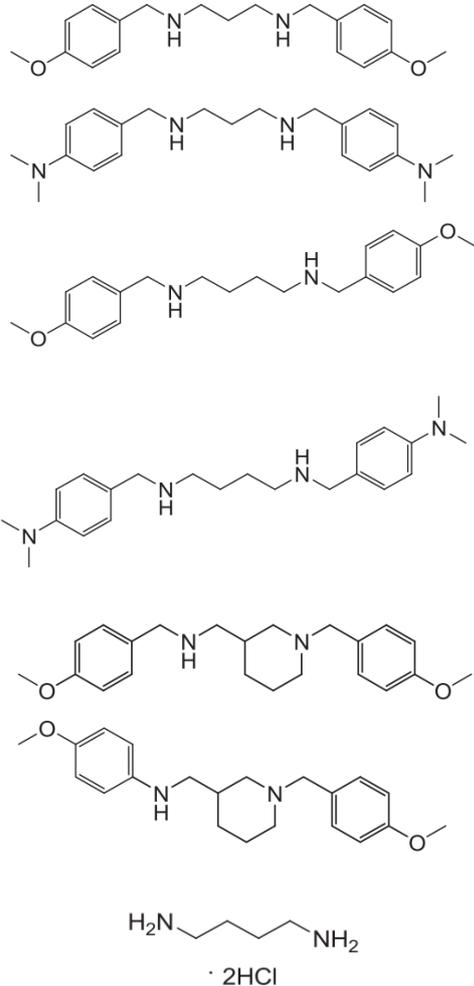
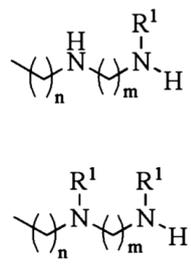
Amino álcoois e diaminas com ação antimicrobiana descrita.

Núcleo principal das moléculas	Ação biológica	
	Agente patológico	Descritor
	<p><i>Leishmania amazonenses</i>; <i>L. chagasi</i>.</p>	<p>(COIMBRA et al., 2010)</p>
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{NH}_2$	<p><i>Trichomonas vaginalis</i>; <i>Giardia lamblia</i>.</p>	<p>(GIORDANI et al., 2011)</p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>· <math>\text{RCH}_2\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2</math></li> <li><math>\text{RCH}_2\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{OH}</math></li> <li>· <math>\text{RCH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}</math></li> <li><math>\text{RCH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2</math></li> </ul>	<p><i>T. vaginalis</i></p>	<p>(GIORDANI et al., 2009)</p>
	<p><i>Schistosoma mansoni</i></p>	<p>(SOUZA FERNANDES et al., 2013)</p>
	<p>Vírus da Hepatite C</p>	<p>(HWANG et al., 2013)</p>

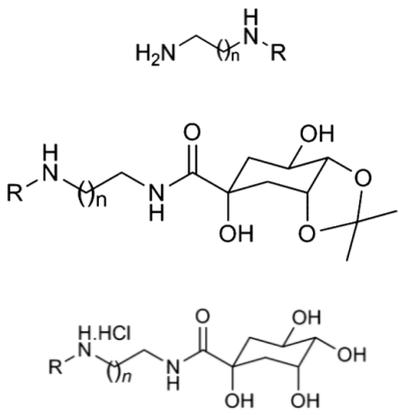
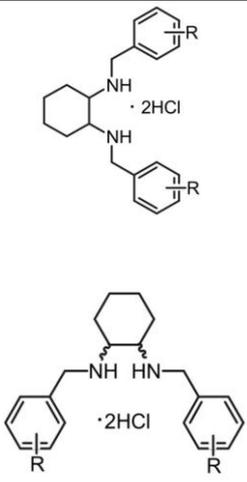
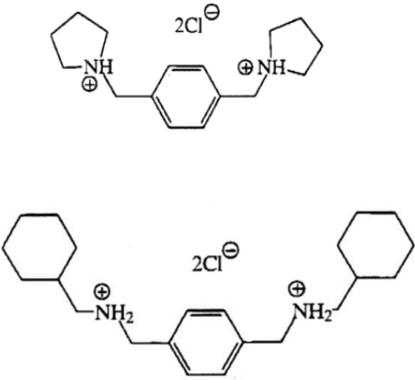
Amino álcoois e diaminas com ação antimicrobiana descrita.

Núcleo principal das moléculas	Ação biológica	
	Agente patológico	Descritor
          	Vírus da Hepatite C	(HWANG et al., 2013)

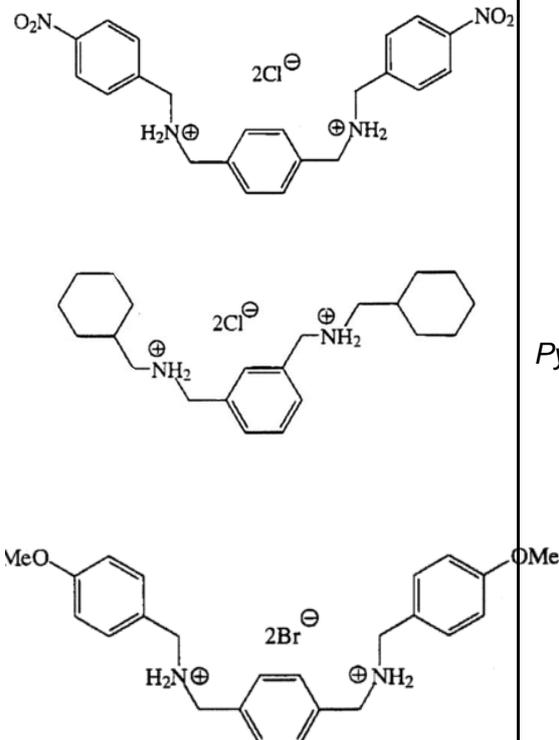
Amino álcoois e diaminas com ação antimicrobiana descrita.

Núcleo principal das moléculas	Ação biológica	
	Agente patológico	Descritor
 <p style="text-align: center;"> <math>\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2 \cdot 2\text{HCl}</math> </p>	Vírus da Hepatite C	(HWANG et al., 2013)
	<i>L. braziliensis</i> , <i>L. chagasi</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i>	(YAMANAKA et al., 2013)

Amino álcoois e diaminas com ação antimicrobiana descrita.

Núcleo principal das moléculas	Ação biológica	
	Agente patológico	Descritor
	<p><i>S. aureus</i>, <i>S. epidermidis</i>, <i>P. aeruginosa</i>, <i>M. tuberculosis</i></p>	<p>(REZENDE JR et al., 2015)</p>
	<p><i>Candida albicans</i>, <i>C. glabrata</i>, <i>Geotrichum candidium</i></p>	<p>(SHARMA et al., 2011)</p>
	<p><i>Pyrenophora avenae</i></p>	<p>(BREAR; WALTERS; ROBINS, 1997).</p>

Amino álcoois e diaminas com ação antimicrobiana descrita.

Núcleo principal das moléculas	Ação biológica	
	Agente patológico	Descritor
 <p> <chem>[NH2+]CC1=CC=C(C=C1)CN2=CC=C(C=C2)[N+](=O)[O-].[Cl-].[Cl-]</chem>  <chem>[NH2+]CC1=CC=C(C=C1)CN2CCCCC2.[Cl-].[Cl-]</chem>  <chem>[NH2+]CC1=CC=C(C=C1)CN2=CC=C(C=C2)OC.[Br-].[Br-]</chem> </p>	<p><i>Pyrenophora avenae</i></p>	<p>(BREAR; WALTERS; ROBINS, 1997).</p>