

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prospecção de sais imidazólicos com potencial antifúngico contra dermatófitos multirresistentes: estudo das relações de estrutura-atividade, dos mecanismos de ação e toxicidade

DAIANE FLORES DALLA LANA

PORTO ALEGRE, 2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prospecção de sais imidazólicos com potencial antifúngico contra dermatófitos multirresistentes: estudo das relações de estrutura-atividade, dos mecanismos de ação e toxicidade

Dissertação apresentada por **Daiane Flores Dalla Lana**
para obtenção do TÍTULO DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Co-orientador: Prof. Dr. Henri Stephan Schrekker

PORTO ALEGRE, 2015

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado acadêmico, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 19 de março de 2015, pela banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Sydney Hartz Alves

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. George Gonzalez Ortega

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

CIP - Catalogação na Publicação

Dalla Lana, Daiane Flores

Prospecção de sais imidazólicos com potencial antifúngico contra dermatófitos multirresistentes: estudo das relações de estrutura-atividade, dos mecanismos de ação e toxicidade / Daiane Flores Dalla Lana. -- 2015.

212 f.

Orientador: Alexandre Meneghello Fuentefria.

Coorientador: Henri Stephan Schrekker.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Dermatofitose. 2. Dermatófitos multirresistentes. 3. Alternativas de tratamento. 4. Sais imidazólicos. 5. Atividade antifúngica. I. Fuentefria, Alexandre Meneghello, orient. II. Schrekker, Henri Stephan, coorient. III. Título

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia Aplicada do Departamento de Análises da Faculdade de Farmácia e no Laboratório de Processos Tecnológicos e Catálise do Instituto de química, ambos da UFRGS, na cidade de Porto Alegre, com financiamento da CAPES e do CNPq. Análises complementares foram realizadas na Central Analítica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS e no laboratório do Núcleo de Pesquisa em Bioquímica, Toxicologia e Imunologia, da UNIPAMPA, na cidade de Uruguaiana. A autora recebeu bolsa de estudos da CAPES.

DEDICATÓRIA

Às pessoas que mais me motivam e me servem de exemplo na vida, meu pai Wilson Dalla Lana e minha tia-avó Adélha Comaretto (in memoriam), por toda dedicação, conselhos e apoio incondicional. Eu sempre vou lembrar-me de vocês com muito carinho e gratidão. Essa conquista é para e por vocês, sem mais!

AGRADECIMENTOS

A Deus, simplesmente por tudo.

À minha família, por acreditar em mim e sempre incentivar os meus estudos. Em especial aos meus pais Wilson e Sandra, que me mostraram a importância da educação e da dedicação em tudo o que se faz; o meu eterno muito obrigada, pelo amor, paciência e auxílio; e a minha irmã Raquel obrigada pelas conversas, carinho e atenção sempre. Eu amo vocês.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria, minha admiração, meu respeito pelo excelente profissional e sincero agradecimento pela confiança, oportunidade e imensa contribuição em minha formação acadêmica. Obrigada também por tratar da micologia com tanto entusiasmo, isso foi determinante para que eu me encantasse por essa temática.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Henri Stephan Schrekker, pelo comprometimento e interesse no meu trabalho. Agradeço mesmo todo o investimento, todas as contribuições e sugestões consideradas. Um exemplo para mim de profissional extremamente dedicado e correto.

Ao Dr. Ricardo Keitel Donato, por incansavelmente ter ajudado no delineamento deste trabalho. Com certeza aprendi muito com você, nossas conversas sempre me acrescentaram muito profissionalmente. Obrigada por toda tua dedicação e empenho. Profissionais como você fazem a diferença.

Aos Profs Dr. Michel M. Machado, Dr. Luis Flávio S. de Oliveira, Dr. George G. Ortega e seus respectivos grupos de pesquisa, pela valiosa cooperação científica.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, por todo aprendizado.

A banca examinadora, pela disponibilidade e atenção em avaliar meu trabalho; já de antemão o meu sincero agradecimento pelas correções, sugestões e ideias.

Aos colegas de laboratório, pelos momentos de intenso trabalho, colaboração, amizade e descontração. A Aline pelo carinho, acolhimento em Porto Alegre e pelos conhecimentos passados, a Renata pela tranquilidade e segurança transmitidas, a Fernanda pelos cafezinhos e risadas, a Gabi Meirelles pela amizade e companheirismo até mesmo nos finais de semana de experimento, a Gabi Machado pela alegria, conversas e disposição, a Michele e a Luciana pela constante troca de conhecimento, a Leti pela parceria de trabalho com os dermatófitos e pelas ideias sugeridas, a Camila pelo auxílio nas análises toxicológicas, o Leonildo e o Yuri pela importante ajuda na síntese dos compostos, aos IC's do laboratório (Camilinha, Aline, Thayse e Eduardo) pela parceria e boa vontade, a Bruna pelo carinho e pela amizade que só aumenta, a Aícha pelas conversas e parceria nos ensaios, aos novos integrantes do grupo Igor e Clarissa, pela parceria nas pesquisas e atenção, e por fim e não menos importante, um muitíssimo obrigada para Vanessa, que desde quando eu cheguei em Porto Alegre, tem se mostrado uma amiga querida, que trouxe mais alegria aos meus dias de trabalho. Eu considero vocês todos como coautores dessa dissertação, a participação de cada um foi essencial. Percebo que ganhei, além de colegas, verdadeiros amigos.

Aos demais colegas do curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelos momentos de aprendizado e convívio, em especial a Ane Elise, a Silvana e a Aline.

Às minhas amigas queridas que sempre me apoiaram nessa fase: Amanda, Esther, Miriam, Dani, Rosana, Camila...desculpem os momentos de ausência, às vezes.

À Katarzyna e ao Leonardo, pelo auxílio na elaboração de alguns desenhos do trabalho, ficaram lindos.

Aos funcionários da Faculdade de Farmácia da UFRGS, pela ajuda e atenção, em especial à Simone, que sempre com um sorriso no rosto dava um incentivo.

À CAPES, pelo essencial apoio financeiro fornecido através da bolsa de estudos.

Enfim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, participaram e colaboraram para a realização deste trabalho, o meu eterno MUITO OBRIGADA!

Nenhum dever é mais importante que a **gratidão!**

*“Lembraí do tempo que levastes para chegar aqui,
De todas as **vitórias** e lágrimas,
De todos os **sorrisos** e fracassos.
Lembraí dos **sonhos realizados**,
Das frustrações, das decepções colhidas.
Lembraí de tudo o que passou.
Ganhastes **mais força, mais sabedoria**
E finalmente podes olhar para o que há diante de ti
E perceber que apenas chegastes ao começo.
- **Que seja um lindo começo!**”*

(Augusto Branco)

RESUMO

As dermatofitoses são infecções cutâneas, causadas por fungos filamentosos dermatofíticos, cuja incidência tem aumentado cada vez mais. Assim, este trabalho teve como objetivo investigar a atividade antidermatofítica de uma série de sais imidazólicos (SIMs, compostos iônicos), determinando-se relações de estrutura-atividade e caracterizando-se o mecanismo de ação e perfil toxicológico dos mesmos, a fim de prospectarem-se alternativas para o tratamento das dermatofitoses. A avaliação da suscetibilidade de 45 isolados clínicos (sensíveis e multirresistentes) de *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*, pós-tratamento *in vitro* com 11 SIMs e antifúngicos comerciais, foi realizada por microdiluição em caldo. Os demais testes, de mecanismo antifúngico e toxicidade, seguiram modelos já bem estabelecidos na literatura. Todos os dermatófitos foram sensíveis aos SIMs, os quais apresentaram faixa de concentração inibitória mínima (CIM) de 0.02 – 50.00 µg/mL. Os menores valores de CIM foram observados para os sais com 16 átomos de carbono na cadeia lateral e ânions cloreto e metanossulfonato. Além disso, somente os sais C₁₆MImCl e C₁₆MImMeS foram fungicidas, sendo que C₁₆MImMeS exerceu esse efeito sobre 100% dos isolados. C₁₆MImCl, C₁₆MImMeS e C₁₆MImNTf₂ provocaram evidentes alterações na morfologia dos dermatófitos multirresistentes, ocasionando um dano celular total de aproximadamente 60 – 80%. Propõe-se que esses 3 SIMs exerçam sua ação antidermatofítica por interação com a membrana celular fúngica, reduzindo o conteúdo de ergosterol e complexando-se com o mesmo. C₁₆MImMeS ainda demonstrou indícios de ação sobre a parede celular dos dermatófitos. Por fim, nenhum dos compostos analisados, nas concentrações testadas, foi citotóxico, mutagênico ou genotóxico a células leucocitárias humanas, o que representa um resultado promissor para uma futura eventual bioaplicação segura dessas substâncias imidazólicas, as quais demonstraram *in vitro* forte potencial antifúngico contra dermatófitos multirresistentes.

Palavras-chave: dermatofitoses, dermatófitos multirresistentes, sais imic atividade antidermatofítica, mecanismos de ação, toxicidade.

ABSTRACT

Prospection of imidazolium salts with antifungal potential against multidrug-resistant dermatophytes: study of structure-activity relationships, mechanisms of action and toxicity. Dermatophytoses are cutaneous infections, caused by dermatophytic filamentous fungi, whose incidence has been increasing. Thereby, this study aimed to investigate the antidermatophytic activity of a series of imidazolium salts (IMs, ionic compounds), with the determination of structure-activity relationships, characterization of the mechanism of action and toxicological profile of these compounds, to the prospection of alternatives for the treatment of dermatophytoses. The evaluation of susceptibility of 45 (susceptible and multidrug-resistant) clinical isolates of *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* and *T. rubrum*, after *in vitro* treatment with eleven IMs and commercial antifungals, was performed by broth microdilution. The other tests of antifungal mechanism and toxicity following models already well established in the literature. All dermatophytes were sensitive to IMs, which showed minimum inhibitory concentration (MIC) range of 0.02 – 50.00 µg/mL. The lowest MIC values were observed for salts with 16 carbon atoms in the side chain and with chloride and methanesulfonate anions. Only the salts C₁₆MI_mCl and C₁₆MI_mMeS were fungicides, wherein C₁₆MI_mMeS exerted this effect on 100% of the isolates. Furthermore, C₁₆MI_mCl, C₁₆MI_mMeS and C₁₆MI_mNTf₂ provoked evident alterations in morphology of multidrug-resistant dermatophytes, causing a total cell damage of approximately 60 – 80%. It is proposed that these three IMs exert their antidermatophytic activity by interaction with the fungal cell membrane, reducing the content of ergosterol and complexing with it. C₁₆MI_mMeS still showed indications of action into the cell wall of dermatophytes. Finally, none of the analyzed compounds were cytotoxic, mutagenic or genotoxic to human leukocytes cells, which is a promising result for future safe bioapplication of these imidazolium substances, that showed *in vitro* strong antifungal potential against multidrug-resistant dermatophytes.

Keywords: dermatophytoses, multidrug-resistant dermatophytes, imidazolium salts, antidermatophytic activity, mechanisms of action, toxicity.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades químicas dos compostos estudados.....	106
Tabela 1. Propriedades químicas dos compostos estudados (continuação).....	107
Tabela 2. Suscetibilidade dos isolados de <i>M. canis</i> (MCA) em relação ao tratamento <i>in vitro</i> com 11 SIMs e 3 antifúngicos comerciais (terbinafina – TBF, griseofulvina – GSF e cetoconazol – CTZ).....	136
Tabela 3. Suscetibilidade dos isolados de <i>M. gypseum</i> (MGY) em relação ao tratamento <i>in vitro</i> com 11 SIMs e 3 antifúngicos comerciais (terbinafina – TBF, griseofulvina – GSF e cetoconazol – CTZ).....	137
Tabela 4. Suscetibilidade dos isolados de <i>T. mentagrophytes</i> (TME) em relação ao tratamento <i>in vitro</i> com 11 SIMs e 3 antifúngicos comerciais (terbinafina – TBF, griseofulvina – GSF e cetoconazol – CTZ).....	138
Tabela 5. Suscetibilidade dos isolados de <i>T. rubrum</i> (TRU) em relação ao tratamento <i>in vitro</i> com 11 SIMs e 3 antifúngicos comerciais (terbinafina – TBF, griseofulvina – GSF e cetoconazol – CTZ).....	139
Tabela 6. CIM ₅₀ e média geométrica dos 11 SIMs e 3 antifúngicos comerciais (terbinafina – TBF, griseofulvina – GSF e cetoconazol – CTZ) em relação às 4 espécies dermatofíticas – <i>M. canis</i> (MCA), <i>M. gypseum</i> (MGY), <i>T. mentagrophytes</i> (TME) e <i>T. rubrum</i> (TRU).....	141
Tabela 7. Comparação estatística dos 11 SIMs com os 3 antifúngicos comerciais (terbinafina – TBF, griseofulvina – GSF e cetoconazol – CTZ) em relação às 4 espécies dermatofíticas – <i>M. canis</i> (MCA), <i>M. gypseum</i> (MGY), <i>T. mentagrophytes</i> (TME) e <i>T. rubrum</i> (TRU).....	145
Tabela 8. CIM dos 11 SIMs e antifúngico cetoconazol (CTZ) em relação a cepas leveduriformes-referência: <i>Candida albicans</i> (CA) ATCC 18804, ATCC 24433 e <i>Candida tropicalis</i> (CT) 750.....	148
Tabela 9. Suscetibilidade dos isolados de <i>M. canis</i> (MCA), <i>M. gypseum</i> (MGY), <i>T. mentagrophytes</i> (TME) e <i>T. rubrum</i> (TRU) em relação ao tratamento <i>in vitro</i> com 11 SIMs e 1 antifúngico comercial (cetoconazol – CTZ) em Caldo Sabouraud Dextrose (CSD).....	149
Tabela 10. Concentração fungicida mínima (CFM), em µg/mL, dos SIMs C ₁₆ MImCl e C ₁₆ MImMeS e antifúngico terbinafina em relação aos dermatófitos do gênero <i>Microsporum</i>	150
Tabela 11. Concentração fungicida mínima (CFM), em µg/mL, dos SIMs C ₁₆ MImCl e C ₁₆ MImMeS e antifúngico terbinafina em relação aos dermatófitos do gênero <i>Trichophyton</i>	151

- Tabela 12.** Efeito sobre a biossíntese do ergosterol fúngico de isolados dermatofíticos multirresistentes, pós-tratamento *in vitro* com os SIMs C₁₆MImCl, C₁₆MImMeS, C₁₆MImNTf₂ e antifúngico cetoconazol (CTZ).....**163**
- Tabela 13.** Análise estatística do efeito sobre a biossíntese de ergosterol fúngico, para comparação entre C₁₆MImCl, C₁₆MImMeS, C₁₆MImNTf₂, cetoconazol e o controle não tratado.....**164**
- Tabela 14.** Valores de CIM do C₁₆MImCl, C₁₆MImMeS, C₁₆MImNTf₂ e da anfotericina B (AFB), em µg/mL, sem e com adição do ergosterol comercial.....**167**
- Tabela 15.** Valores de CIM do C₁₆MImCl, C₁₆MImMeS, C₁₆MImNTf₂ e da anidulafungina (ANF), em µg/mL, sem e com adição de sorbitol.....**170**
- Tabela 16.** Análise estatística de comparação dos SIMs C₁₆MImCl, C₁₆MImMeS e C₁₆MImNTf₂ com o Dodecilsulfato de sódio (SDS) 2%, em diferentes tempos.....**173**

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagens da macro (a) e micromorfologia (b) de *Microsporium canis* (FONTE: MYCOLOGY ONLINE – National Mycology Reference Centre, 2014).....**53**
- Figura 2.** Imagens da macro (a) e micromorfologia (b) de *Microsporium gypseum* (FONTE: MYCOLOGY ONLINE – National Mycology Reference Centre, 2014).....**54**
- Figura 3.** Imagens da macro (a) e micromorfologia (b) de *Trichophyton mentagrophytes* (FONTE: MYCOLOGY ONLINE – National Mycology Reference Centre, 2014).....**56**
- Figura 4.** Imagens da macro (a) e micromorfologia (b) de *Trichophyton rubrum* (FONTE: MYCOLOGY ONLINE – National Mycology Reference Centre, 2014).....**58**
- Figura 5.** Imagens de lesões características das distintas formas clínicas de dermatofitose: (a) *tinea capitis* (couro cabeludo), (b) *tinea corporis* (corpo), (c) *tinea cruris* (grandes pregas), (d) *tinea unguium* (unha), (e) *tinea barbae* (barba), (f) *tinea manuum* (mãos) e (g) *tinea pedis* (pés) (FONTE: MYCOLOGY ONLINE – National Mycology Reference Centre; DOCTOR FUNGUS, 2014).....**60**
- Figura 6.** Imagens dos tipos de comprometimento ungueal nas onicomicoses dermatofíticas: (a) forma subungueal distal (b) forma subungueal proximal (c) forma superficial (leuconíquia micótica/tricofítica/branca) (FONTE: adaptado de WELSH; VERA-CABRERA; WELSH, 2010).....**65**
- Figura 7.** Estrutura e propriedades químicas do ciclopirox olamina (FONTE: CHEMSPIDER, 2014).....**75**
- Figura 8.** Estrutura e propriedades químicas da terbinafina (FONTE: CHEMSPIDER, 2014).....**77**
- Figura 9.** Principais marcos no desenvolvimento dos antifúngicos ao longo do século XX (FONTE: adaptado de LEMSADDEK, 2008).....**79**
- Figura 10.** Estrutura e propriedades químicas da griseofulvina (FONTE: CHEMSPIDER, 2014).....**79**
- Figura 11.** Estrutura e propriedades químicas do cetoconazol (FONTE: CHEMSPIDER, 2014).....**81**
- Figura 12.** Mecanismos de resistência fúngica (FONTE: LOURENÇO, 2014).....**88**

- Figura 13.** Representação esquemática – (a) estrutura do núcleo 1,3-dialquilimidazólio (FONTE: FRANZOI et al., 2011) e (b) estrutura química anfífila de um sal imidazólico (cloreto de 1-*n*-dodecil-3-metilimidazólio) – regiões hidrofóbicas em vermelho e regiões hidrofílicas em azul (FONTE: adaptado de MARKIEWICZ, 2012; RIDUAN; ZHANG, 2013).....**91**
- Figura 14.** Representação esquemática das subclasses dos sais imidazólicos (FONTE: adaptado de RODRIGUES, 2010).....**92**
- Figura 15.** Histórico gráfico da produção científica e tecnológica envolvendo líquidos iônicos, dentre esses LIs imidazólicos, entre os anos 1990 até 2006 e número de artigos relacionados aos LIs, publicados em diferentes áreas do conhecimento, de 2000 a 2009, conforme classificação do portal Web of Science (FONTE: RODRIGUES, 2010).....**95**
- Figura 16.** Histórico gráfico das publicações científicas envolvendo líquidos iônicos, dentre esses LIs imidazólicos, de 2008 a 2014, conforme classificação do portal Web of Science.....**95**
- Figura 17.** Figura representativa das variadas aplicações dos SIMs-LIs em diferentes áreas da ciência (FONTE: adaptado de LIS et al., 1987; ZHANG et al., 2009; RODRIGUES, 2010; ELSHAARAWYA; JANIAC, 2014; FARAL-TELLO et al., 2014).....**98**
- Figura 18.** Esquema geral de síntese dos SIMs-LIs – (a) reações de substituição nucleofílica, nas quais R e R` representam cadeias alquílicas e X o contra-íon e (b) troca iônica, na qual R e R` representam cadeias alquílicas, X e Y o ânion e M representa um metal (FONTE: SATO, 2011).....**104**
- Figura 19.** Combinações entre cátions e ânions dos SIMs estudados. MIm: metilimidazólio, [Cl]: ânion cloreto, [MeS]: ânion metanossulfonato ou mesilato, [NTf₂]: ânion bis(trifluorometilsulfonil)amida ou N-triflato, [OcS]: ânion octanossulfonato, [SaC]: ânion salicilato.....**105**
- Figura 20.** Estrutura química do sal imidazólico (líquido iônico imidazólico a temperatura ambiente) C₄MImCl (FONTE: CHEMDRAW Std 14.0).....**107**
- Figura 21.** Estrutura química do sal imidazólico C₄MImMeS (FONTE: CHEMDRAW Std 14.0).....**108**
- Figura 22.** Estrutura química do sal imidazólico C₄MImOcS (FONTE: CHEMDRAW Std 14.0).....**108**
- Figura 23.** Estrutura química do sal imidazólico C₉MImMeS (FONTE: CHEMDRAW Std 14.0).....**108**
- Figura 24.** Estrutura química do sal imidazólico (líquido iônico imidazólico a temperatura ambiente) C₁₀MImCl (FONTE: CHEMDRAW Std 14.0).....**109**

Figura 25. Estrutura química do sal imidazólico (C ₁₀) ₂ MImCl (FONTE: CHEMDRAW Std 14.0).....	109
Figura 26. Estrutura química do sal imidazólico C ₁₆ MImCl (FONTE: CHEMDRAW Std 14.0).....	109
Figura 27. Estrutura química do sal imidazólico C ₁₆ MImMeS (FONTE: CHEMDRAW Std 14.0).....	110
Figura 28. Estrutura química do sal imidazólico C ₁₆ MImNTf ₂ (FONTE: CHEMDRAW Std 14.0).....	110
Figura 29. Estrutura química do sal imidazólico C ₁₆ MImSaC (FONTE: CHEMDRAW Std 14.0).....	110
Figura 30. Estrutura química do sal imidazólico C ₁₈ MImCl (FONTE: CHEMDRAW Std 14.0).....	111
Figura 31. Gráfico boxplot, com a mediana, primeiro (25%) e terceiro (75%) quartil e mínimo e máximo das CIM`s de seis SIMs (C ₄ MImCl, C ₁₀ MImCl, C ₁₆ MImCl, C ₁₈ MImCl, C ₁₆ MImNTf ₂ e C ₁₆ MImMeS) e um antifúngico (terbinafina – TBF).....	146
Figura 32. Imagem de uma microplaca do teste de suscetibilidade, após 14 dias de incubação a 30 °C, com o dermatófito <i>Trichophyton mentagrophytes</i> (TME 16*), pós-tratamento com os SIMs – C ₁₆ MImMeS, C ₁₆ MImNTf ₂ e C ₁₆ MImCl e antifúngico cetoconazol.....	147
Figura 33. Relação do efeito fungicida (a) e da CIM ₅₀ (b) dos SIMs – C ₁₆ MImCl, C ₁₆ MImMeS e antifúngico terbinafina (TBF).....	152
Figura 34. Imagens da micromorfologia de <i>T. mentagrophytes</i> (TME 16*) pós-tratamento <i>in vitro</i> com 3 SIMs, em concentrações sub-inibitórias; (a, b) – controle sem tratamento, (c, d) – C ₁₆ MImCl, (e, f) – C ₁₆ MImMeS e (g, h) – C ₁₆ MImNTf ₂	153
Figura 35. Imagens da microscopia eletrônica de varredura de <i>T. mentagrophytes</i> (TME 16*) pós-tratamento <i>in vitro</i> com 3 SIMs, em concentrações sub-inibitórias; (a, b) – controle sem tratamento, (c, d) – C ₁₆ MImCl, (e, f) – C ₁₆ MImMeS e (g, h) – C ₁₆ MImNTf ₂	155
Figura 36. Representação gráfica do dano celular dos isolados multirresistentes das 4 espécies dermatofíticas – <i>M. canis</i> (MCA), <i>M. gypseum</i> (MGY), <i>T. mentagrophytes</i> (TME) e <i>T. rubrum</i> (TRU), expresso em percentagem, pós-tratamento com os C ₁₆ MImCl, C ₁₆ MImMeS, C ₁₆ MImNTf ₂ e cetoconazol (CTZ). Barras com a mesma letra são estatisticamente equivalentes.....	
Figura 37. Curvas de morte de 4 dermatófitos multirresistentes – <i>M. canis</i> (MCA 36*), <i>M. gypseum</i> (MGY 58*), <i>T. mentagrophytes</i> (TME 34*) e <i>T. rubrum</i> (TRU 43*) baseadas na ação fungicida do C ₁₆ MImMeS, em três diferentes concentrações	

correspondentes a CIM, 2xCIM e 4xCIM para cada isolado fúngico, comparado ao controle sem tratamento.....159

Figura 38. Imagens das placas de petri, na diluição 10^{-2} , utilizadas para contagem de colônias, na determinação das curvas de morte de *M. canis* (MCA 36*), *M. gypseum* (MGY 58*), *T. mentagrophytes* (TME 34*) e *T. rubrum* (TRU 43*), pós-tratamento *in vitro* com o C₁₆MImMeS, no tempo inicial de 1 hora.....160

Figura 39. Imagens das placas de petri, na diluição 10^{-2} , utilizadas para contagem de colônias, na determinação das curvas de morte de *M. canis* (MCA 36*), *M. gypseum* (MGY 58*), *T. mentagrophytes* (TME 34*) e *T. rubrum* (TRU 43*), pós-tratamento *in vitro* com o C₁₆MImMeS, no tempo final de 48 horas.....161

Figura 40. Variação nas CIM's de C₁₆MImCl, C₁₆MImMeS, C₁₆MImNTf₂ e da anfotericina B (AFB), na presença de ergosterol exógeno, em relação a isolados multirresistentes de *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*.....168

Figura 41. Variação nas CIM's de C₁₆MImCl, C₁₆MImMeS, C₁₆MImNTf₂ e da anidulafungina (ANF), na presença de sorbitol, em relação a isolados multirresistentes de *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*.....171

Figura 42. Percentagem de lise celular de isolados multirresistentes de *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*, pós-tratamento *in vitro* com C₁₆MImCl, C₁₆MImMeS, C₁₆MImNTf₂ e SDS 2%.....172

Figura 43. Imagem representativa dos mecanismos de ação dos SIMs C₁₆MImCl, C₁₆MImMeS e C₁₆MImNTf₂.....174

Figura 44. Esquema ilustrativo de representação do potencial antidermatofítico de SIMs e antifúngicos comerciais.....176

Figura 45. Gráficos da análise toxicológica. Efeitos dos SIMs C₁₆MImCl, C₁₆MImMeS e C₁₆MImNTf₂ sobre a (1) proliferação e (2) viabilidade celular. Barras com letras iguais indicam equivalência estatística.....177

Figura 46. Gráficos da análise toxicológica. Efeitos dos SIMs C₁₆MImCl, C₁₆MImMeS e C₁₆MImNTf₂ sobre a (1) frequência de micronúcleos e (2) dano ao DNA. Barras com letras iguais indicam equivalência estatística.....178

Figura 47. Gráfico da análise toxicológica. Efeitos dos SIMs C₁₆MImCl, C₁₆MImMeS e C₁₆MImNTf₂ sobre a estabilidade cromossômica numérica. Barras com letras iguais indicam equivalência estatística.....180

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABD – Agar Batata Dextrose

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

AFB – anfotericina B

[AMIm]Br – brometo de 1-alquil-3-metilimidazólio

[AMMIm]Br – brometo de 1-alquil-2,3-dimetilimidazólio

ANF – anidulafungina

ANOVA – análise de variância

ASD – Agar Sabouraud Dextrose

ATCC – American Type Culture Collection

[BF₄] – ânion tetrafluoroborato

[Br] – ânion brometo

CEM – concentração efetiva mínima

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

[CF₃COO] – ânion trifluoroacetato

CFM, CFM`s – concentração fungicida mínima, concentrações fungicidas mínimas

CIM, CIM`s – concentração inibitória mínima, concentrações inibitórias mínimas

CIM₅₀ – concentração mínima que inibe 50% dos isolados fúngicos

[Cl] – ânion cloreto

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

CO₂ – dióxido de carbono

CPO – ciclopirox olamina

CSD – Caldo Sabouraud Dextrose

CTZ – cetoconazol

DC% – percentagem de dano celular

24(28)DHE – 24(28)-diidroergosterol

[dMP] – dimetilfosfato

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleic

E. floccosum – *Epidermophyton floccosum*

[EMIM] – 1-etil-3-metilimidazólio

GPMA – Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada

GSF – griseofulvina

h – horas

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

[HDEA] [Cl] – cloreto de dietanolamina

ID – índice de dano

LI, LIs – líquido iônico imidazólico, líquidos iônicos imidazólicos

M – Molar

MG – média geométrica

M. canis – *Microsporum canis*

MeS ou [OMS] – ânion metanossulfonato

MEV – microscopia eletrônica de varredura

M. gypseum – *Microsporum gypseum*

MIm – metilimidazólio

min. – minutos

MN – micronúcleos

MNIB – brometo de 1-mesitil-3-(2-nafitoilmetano)-1H-imidazólio

MO – Microscopia ótica

MOPS – ácido 3-morfolinopropanosulfônico

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

[NO₃] – ânion nitrato

NR₄⁺ – cátion quaternário de amônio

NTf₂⁻ ou [Tf₂N] – ânion bis(trifluorometilsulfonyl)amida/ N-triflato

OcS – octanossulfonato

p – p-value ou nível descritivo

PAS – ácido de Schiff

PBS – tampão fosfato salin

PCR – reação em cadeia da polimerase
[PF₆] – ânion hexafluorofosfato
pH – potencial hidrogênico
PPGCF – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
rpm – rotações por minuto
RPMI – Meio Roswell Park Memorial Institute
RS – Rio Grande do Sul
SaC – ânion salicilato
SDS – Dodecil sulfato de sódio
SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SIM, SIMs – sal imidazólico, sais imidazólicos
S_N – substituição nucleofílica
SP – São Paulo
S-S – ligações sulfeto
TBa – *tinea barbae*
TBF – terbinafina
TCa – *tinea capitis*
TCo – *tinea corporis*
TCr – *tinea cruris*
[TEA][HOAc] – acetato de trietanolamina
TMa – *tinea manuum*
T. mentagrophytes – *Trichophyton mentagrophytes*
TPe – *tinea pedis*
T. rubrum – *Trichophyton rubrum*
[Ts] – *p*-toluenossulfonato (tosilato)
T. schoenleinii – *Trichophyton schoenleinii*
T. tonsurans – *Trichophyton tonsurans*
TUn – *Tinea unguium*

T. violaceum – *Trichophyton violaceum*

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

V – volt

var. – variedade

Abreviaturas (códigos) dos sais imidazólicos:

C₄MImCl – cloreto de 1-*n*-butil-3-metilimidazólio

C₄MImMeS – metanossulfonato de 1-*n*-butil-3-metilimidazólio

C₄MImOcS – octanossulfonato de 1-*n*-butil-3-metilimidazólio

C₉MImMeS – metanossulfonato de 1-*n*-ciclohexilpropil-3-metilimidazólio

C₁₀MImCl – cloreto de 1-*n*-decil-3-metilimidazólio

(C₁₀)₂MImCl – cloreto de 1,3-di-*n*-decil-2-metilimidazólio

C₁₆MImCl – cloreto de 1-*n*-hexadecil-3-metilimidazólio

C₁₆MImMeS – metanossulfonato de 1-*n*-hexadecil-3-metilimidazólio

C₁₆MImNTf₂ – bis(trifluorometilsulfonil)amida de 1-*n*-hexadecil-3-metilimidazólio

C₁₆MImSaC – hidroxibenzoato(salicilato) de 1-*n*-hexadecil-3-metilimidazólio

C₁₈MImCl – cloreto de 1-*n*-octadecil-3-metilimidazólio

APRESENTAÇÃO

De acordo com as normas vigentes no Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) – Recomendações para elaboração de teses e dissertações – revisado em setembro de 2011 de acordo com resolução CEPE 12/2007 e resolução CAMPG 93/2007, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), a presente dissertação de mestrado acadêmico segue o modelo de sequência clássica, ordenada nos seguintes conteúdos:

- 1) Introdução e relevância do tema
- 2) Objetivos
- 3) Revisão bibliográfica
- 4) Parte Experimental
- 5) Resultados e Discussão
- 6) Conclusões e perspectivas
- 7) Referências Bibliográficas

Esta dissertação, de acordo com orientações do PPGCF da UFRGS, segue os padrões técnicos de formatação estabelecidos pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), através da NBR 6023/2002; NBR 10520/2002 e NBR 14724/2011.

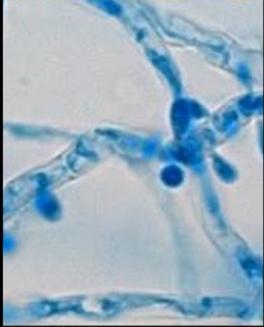
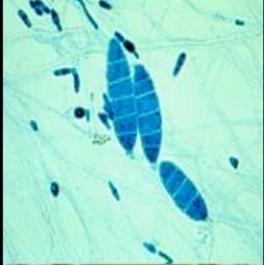
SUMÁRIO

CAPA	
FOLHA DE ROSTO	
DESCRIÇÃO DOS LOCAIS ONDE O TRABALHO FOI DESENVOLVIDO	
DEDICATÓRIA	
AGRADECIMENTOS	
EPÍGRAFE	
RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
APRESENTAÇÃO	
1. INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA.....	39
2. OBJETIVOS.....	45
2.1. Objetivo geral.....	45
2.2. Objetivos específicos.....	45
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	49
3.1. Dermatofitoses.....	49
3.1.1. Agentes etiológicos – Fungos dermatófitos.....	49
3.1.2. Formas clínicas.....	58
3.1.3. Diagnóstico, prevenção e controle.....	70
3.2. Terapêutica das dermatofitoses.....	73
3.2.1. Tratamento convencional.....	73
3.2.1.1. Ciclopirox olamina.....	74
3.2.1.2. Terbinafina.....	76
3.2.1.3. Griseofulvina.....	78
3.2.1.4. Cetoconazol.....	80
3.2.1.5. Tratamento combinado.....	82
3.2.2. Novos compostos com potencial antidermatofítico.....	84

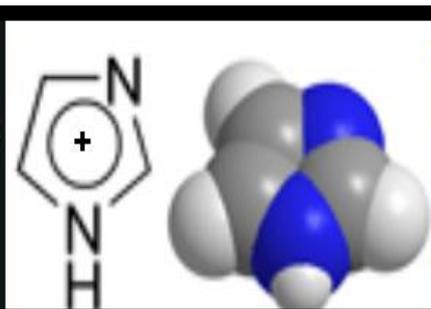
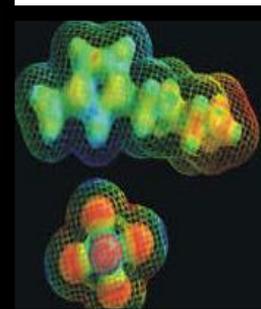
3.2.3. Problemas relacionados à terapêutica e resistência dermatofítica aos antifúngicos.....	85
3.3. Sais imidazólicos (SIMs).....	90
3.3.1. Conceito e propriedades químicas.....	90
3.3.2. Aplicações, potencial biológico e toxicidade.....	93
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	104
4.1. Sais imidazólicos.....	104
4.1.1. Síntese.....	104
4.1.2. Estrutura e propriedades químicas.....	105
4.1.3. Preparo das soluções.....	111
4.2. Agentes antifúngicos e preparo das soluções.....	111
4.3. Fungos dermatófitos.....	112
4.4. Avaliação do potencial antidermatofítico.....	113
4.4.1. Teste de suscetibilidade.....	113
4.4.1.1. SIMs selecionados para o estudo.....	113
4.4.1.2. Agentes antifúngicos selecionados para o estudo.....	113
4.4.1.3. Isolados clínicos dermatofíticos selecionados para o estudo.....	113
4.4.1.4. Técnica.....	113
4.4.1.4.1. Preparo do inóculo fúngico.....	113
4.4.1.4.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM).....	114
4.4.1.5. Estatística.....	117
4.4.2. Análise do efeito sobre a micromorfologia dermatofítica.....	117
4.4.2.1. SIMs selecionados para o estudo.....	117
4.4.2.2. Isolados clínicos dermatofíticos selecionados para o estudo.....	117
4.4.2.3. Microscopia ótica (MO).....	117
4.4.2.3.1. Técnica.....	117
4.4.2.4. Mcroscopia eletrônica de varredura (MEV).....	118
4.4.2.4.1. Técnica.....	118
4.4.3. Análise do dano celular dermatofítico.....	119
4.4.3.1. SIMs selecionados para o estudo.....	119
4.4.3.2. Agente antifúngico selecionado para o estudo.....	119
4.4.3.3. Isolados clínicos dermatofíticos selecionados para o estudo.....	199

4.4.3.4. Técnica.....	119
4.4.3.5. Estatística.....	120
4.4.4. Determinação das curvas de morte (<i>time kill assay</i>).....	120
4.4.4.1. SIMs selecionados para o estudo.....	120
4.4.4.2. Isolados clínicos dermatofílicos selecionados para o estudo.....	120
4.4.4.3. Técnica.....	120
4.5. Avaliação dos mecanismos de ação.....	121
4.5.1. SIMs selecionados para o estudo.....	121
4.5.2. Isolados clínicos dermatofílicos selecionados para o estudo.....	121
4.5.3. Análise do efeito sobre a biossíntese do ergosterol (ensaio do ergosterol quantitativo).....	121
4.5.3.1. Agente antifúngico selecionado para o estudo.....	121
4.5.3.2. Técnica.....	122
4.5.3.3. Estatística.....	123
4.5.4. Análise do efeito de complexação com ergosterol exógeno (ensaio do ergosterol qualitativo).....	123
4.5.4.1. Agente antifúngico selecionado para o estudo.....	123
4.5.4.2. Técnica.....	123
4.5.5. Análise do efeito sobre a parede celular fúngica (ensaio do sorbitol).....	124
4.5.5.1. Agente antifúngico selecionado para o estudo.....	124
4.5.5.2. Técnica.....	124
4.5.6. Análise do efeito de lise celular.....	125
4.5.6.1. Composto controle selecionado para o estudo.....	125
4.5.6.2. Técnica.....	125
4.5.6.3. Estatística.....	126
4.6. Avaliação da toxicidade.....	126
4.6.1. SIMs selecionados para o estudo, concentrações testadas e preparo das soluções.....	126
4.6.2. Cultura celular.....	126
4.6.3. Avaliação da citotoxicidade (efeito sobre a proliferação e viabilidade celular).....	127
4.6.3.1. Técnica.....	127
4.6.3.2. Estatística.....	128

4.6.4. Avaliação da mutagenicidade (análise da frequência de micronúcleos (MN)).....	128
4.6.4.1. Técnica.....	128
4.6.4.2. Estatística.....	129
4.6.5. Avaliação da genotoxicidade (ensaio cometa alcalino).....	129
4.6.5.1. Técnica.....	129
4.6.5.2. Estatística.....	130
4.6.6. Avaliação do efeito sobre a estabilidade cromossômica.....	131
4.6.6.1. Técnica.....	131
4.6.6.2. Estatística.....	131
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	135
5.1. Avaliação do potencial antidermatofítico.....	135
5.1.1. Análise da suscetibilidade.....	135
5.1.2. Análise do efeito sobre a micromorfologia dermatofítica.....	152
5.1.2.1. Microscopia ótica (MO).....	152
5.1.2.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	154
5.1.3. Análise do dano celular dermatofítico.....	156
5.1.4. Determinação das curvas de morte.....	158
5.2. Avaliação dos mecanismos de ação.....	163
5.2.1. Análise do efeito sobre a biossíntese do ergosterol.....	163
5.2.2. Análise do efeito de complexação com ergosterol exógeno.....	166
5.2.3. Análise do efeito sobre a parede celular fúngica.....	169
5.2.4. Análise do efeito de lise celular.....	172
5.3. Relação dos mecanismos antidermatofíticos observados.....	174
5.4. Avaliação da toxicidade.....	176
5.4.1. Avaliação da citotoxicidade (efeito sobre a proliferação e viabilidade celular).....	176
5.4.2. Avaliação da mutagenicidade (análise da frequência de micronúcleos) e genotoxicidade (dano ao DNA).....	178
5.4.3. Avaliação do efeito sobre a estabilidade cromossômica.....	180
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	185
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	190



INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA



1. INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA

As doenças ocasionadas por fungos têm levado a óbito mais pessoas, por ano, do que a malária, e na agricultura, representam uma ameaça à produtividade dos cultivos e à segurança alimentar (GAFFI, 2014; WHO, 2014; PARKER et al., 2014). As micoses, pela grande relevância na prática médica e altíssima frequência com que acometem a população, são consideradas um problema de saúde pública (PEREIRA et al., 2014). As lesões decorrentes das infecções fúngicas manifestam-se, do ponto de vista clínico, nas mais diversas formas, podendo ser classificadas de acordo com as suas localizações no organismo. Quando essas infecções restringem-se às camadas mais superficiais e queratinizadas da pele, cabelos e unhas são denominadas micoses superficiais e cutâneas, representadas principalmente pelas dermatofitoses (CORRALO; HERAS-ALONSO; ACEBES, 2014; INDIRA et al., 2014; PEREIRA et al., 2014). Essas infecções micóticas mais superficiais são consideradas uma importante causa de morbidade e de consultas dermatológicas, afetando aproximadamente 20 – 25% da população em geral, com absoluta tendência de aumento desse índice no decorrer dos anos (HAVLICHOVA; CZAICA; FRIEDRICH, 2008; CALADO et al., 2011; MAULINGKAR; PINTO; RODRIGUES, 2010).

As dermatofitoses, uma das primeiras micoses conhecidas da humanidade, comumente ocorrem no mundo todo, apresentando uma maior prevalência em países de clima tropical e subtropical (MAHALE et al., 2014). Essas áreas abrangem mais de 50% da população mundial e possuem elevados níveis de temperatura e umidade relativa, que fornecem condições favoráveis para o desenvolvimento fúngico (CLARK; FELDMAN; GERTLER, 2000; INDIRA et al., 2014; MAHALE et al., 2014). Estudos epidemiológicos indicam que as dermatofitoses figuram entre as doenças micóticas de maior ocorrência, sendo consideradas o terceiro distúrbio dermatológico mais frequente em crianças menores de 12 anos e o segundo em adultos (CORTEZ et al., 2012). Surpreendentemente, em 2001, no Japão, constatou-se mais de 12 milhões de indivíduos com dermatofitose, sendo que nesse mesmo ano, nos EUA, a percentagem de pacientes com essa micose cutânea chegava a 20% (WATANABE et al., 2001; VANDER; HOSSAIN; GHANNOUM, 2003; MARUYAMA et al., 2003).

No Brasil, a prevalência das dermatofitoses entre lesões cutâneas varia entre 18 a 23% (BRILHANTE et al., 2000; SIQUEIRA et al., 2006; PIRES et al., 2014). No Rio Grande do Sul (RS), em Porto Alegre, realizou-se uma análise retrospectiva dos exames micológicos, do serviço de dermatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), durante o período de 1998 a 2006, constatando-se que das 5.077 amostras coletadas, 2.033 (40%) foram positivas para dermatofitose, o que representa um elevado percentual, quando se compara com outros tipos de micose (AQUINO; CONSTANTE; BAKOS, 2007). Esses dados corroboram com o estudo de BRILHANTE et al. (2000) que evidencia os dermatófitos como o grupo de fungos mais frequentemente isolados em laboratórios de micologia clínica; porém por não figurarem entre as doenças de notificação obrigatória no Brasil, estima-se que mais casos de dermatofitose ocorram na realidade (BRILHANTE et al., 2000; MADRID; MATTEI, 2011). Além disso, essa infecção fúngica configura-se em um grave problema veterinário, por ser uma zoonose ou antropozoonose bem comum, cuja ocorrência é influenciada por fatores ambientais e de manejo (COPETTI et al., 2006; PEREIRA et al., 2006; CHERMETTE; FERREIRO; GUILLOT, 2008; MADRID; MATTEI, 2011).

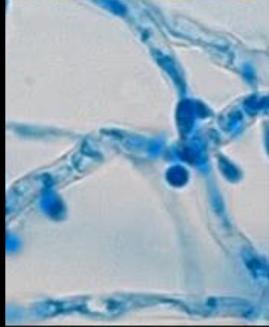
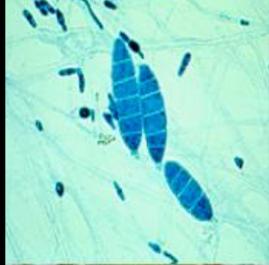
As dermatofitoses compreendem uma extensa variedade de condições e sintomas distintos. O quadro clínico mais comum inclui despigmentação, placas anulares, coceira e perda de cabelo, ou seja, lesões tipicamente cutâneas conhecidas pelo nome genérico de tinhas (do latim *tinea*) (MORAES et al., 2001; TEIXEIRA; GRIPP, 2014). Essas lesões, infectocontagiosas e extremamente impactantes na qualidade de vida dos pacientes, são ocasionadas por fungos filamentosos dermatofíticos de três gêneros anamórficos: *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton* (MORAES et al., 2001).

O tratamento das dermatofitoses faz-se, de modo geral, com o uso de antifúngicos tópicos e/ou sistêmicos, associados ou não a antibacterianos e substâncias queratolíticas (RESENDE, 2008). A partir de observações clínicas práticas, percebe-se que os antifúngicos disponíveis comercialmente são, por vezes, muito dispendiosos e, em alguns casos, desencadeiam sérias reações adversas (MARTINEZ, 2006; ROBINSON, 2014). Além disso, como agravante, as espécies dermatofíticas vêm desenvolvendo cada vez mais resistência e até mesmo multirresistência a terapêutica antifúngica convencional, o que ocasiona uma suscetibilidade muito variável *in vitro* e *in vivo*, aumento progressivo do número de

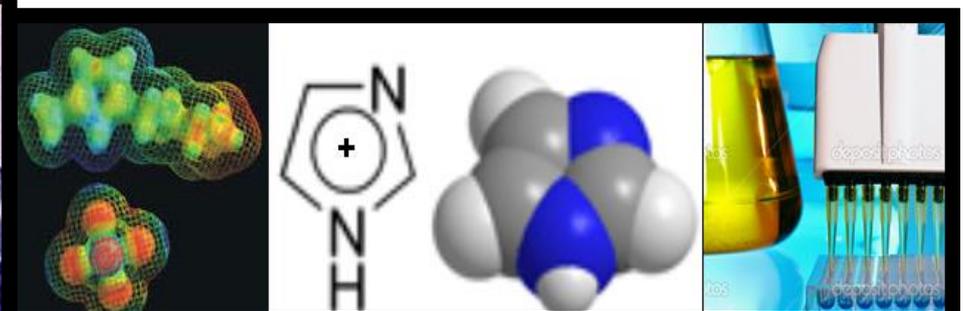
recidivas e não responsividade aos fármacos antimicóticos usuais (MUKHERJEE et al., 2003; LAKSHMIPATHY; KANNABIRAN, 2010; ACHTERMAN; WHITE, 2013).

O desenvolvimento de novos agentes antifúngicos continua, porém ainda não se encontrou um medicamento completamente ideal em relação à segurança, eficácia e curtos períodos de tratamento (KATHIRAVAN et al., 2012; PARKER et al., 2014). O avanço na terapêutica das dermatofitoses em termos clínicos reais está longe de ser totalmente satisfatório e continua sendo problemático o manejo farmacológico dessas micoses em pacientes transplantados, com alguma doença de base (hipertensão, diabetes, nefrite, entre outras) e/ou que apresentam algum tipo de imunodeficiência (SEYMOR, 2000; CHANG et al., 2007). Logo, a casuística das dermatofitoses em conjunto com os dados epidemiológicos, que ressaltam a importância dessa micose na clínica, e os problemas no tratamento das mesmas motivam novas pesquisas que forneçam alternativas terapêuticas potenciais (KATHIRAVAN et al., 2012; PARKER et al., 2014).

Os sais imidazólicos (SIMs) são, estruturalmente, compostos iônicos com uma unidade imidazólica catiônica associada a um ânion (BICZAK et al., 2014). Alguns desses sais são líquidos iônicos imidazólicos (LIs), por apresentarem-se no estado líquido em temperaturas de até 100 °C (BICZAK et al., 2014). As propriedades físico-químicas vantajosas desses compostos, como pressão de vapor desprezível e alta estabilidade térmica e química, aliadas à facilidade de síntese, transformam essas substâncias em uma classe promissora para o desenvolvimento de novas moléculas bioativas (ANDERSON; LONG, 2010; BICZAK et al., 2014). Adicionalmente a isso, já se relataram na literatura atividades biológicas importantes para os SIMs-LIs, tais como antiarrítmica (LIS et al., 1987), antifibrótica (ZHANG et al., 2009), antibacteriana (COLEMAN et al., 2012), anti-inflamatória (GAO et al., 2013), anticâncer (GAO et al., 2013), antileveduriforme (SCHREKKER et al., 2013), entre outras (ZHAO et al., 2008; ANDERSON; LONG, 2010; HUANG et al., 2011). Desse modo, nesse estudo investigou-se, pela primeira vez, a atividade antidermatofítica (inclusive em relação a isolados clínicos multirresistentes) de uma série específica de SIMs, incluindo dois LIs. Estabeleceram-se importantes relações de estrutura-atividade, caracterizando-se o mecanismo de ação desses sais e avaliando-se a toxicidade dos mesmos, com a finalidade principal de prospectar alternativas terapêuticas potencialmente eficazes e seguras para os casos de dermatofitose.



OBJETIVOS



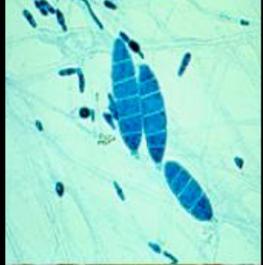
2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

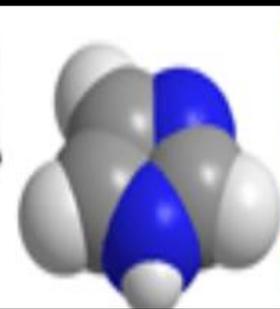
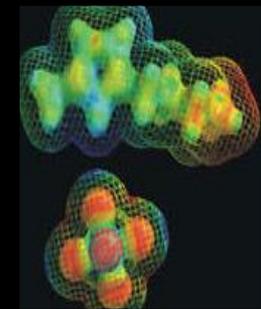
Avaliar o potencial antidermatofítico de uma série de sais imidazólicos em relação às espécies dos gêneros *Microsporum* e *Trichophyton*, estabelecendo-se relações de estrutura-atividade, bem como caracterizar *in vitro* os prováveis mecanismos de ação dos sais mais efetivos e analisar a toxicidade desses compostos.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o perfil de suscetibilidade de 45 isolados clínicos dermatofíticos (9 *Microsporum canis*, 12 *Microsporum gypseum*, 12 *Trichophyton mentagrophytes* e 12 *Trichophyton rubrum*), em resposta ao tratamento *in vitro* com 11 SIMs, determinando-se as concentrações inibitórias e fungicidas mínimas (CIM e CFM) desses compostos.
- ✓ Comparar a efetividade dos SIMs entre si, por observação da CIM, e com os antifúngicos comerciais terbinafina, griseofulvina e cetoconazol, por análises estatísticas, estabelecendo-se, a partir disso, as relações de estrutura atividade.
- ✓ Analisar o efeito dos SIMs mais efetivos sobre a micromorfologia de dermatófitos multirresistentes, por observação de imagens de microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura.
- ✓ Determinar a percentagem de dano celular que os SIMs ocasionam nos isolados clínicos multirresistentes.
- ✓ Investigar o tempo de ação fungicida do SIM que mais amplamente apresentou esse efeito nos dermatófitos, determinando-se curvas de morte.
- ✓ Sugerir prováveis mecanismos de ação antidermatofítica dos SIMs mais efetivos, por investigação da capacidade de interação dessas substâncias com a membrana e parede celular fúngica.
- ✓ Verificar o perfil toxicológico dos SIMs em relação a células leucocitárias humanas, averiguando-se a possível citotoxicidade, mutagenicidade, genotoxicidade e efeito sobre a estabilidade cromossômica dos mesmos.



REVISÃO BIBLIOGRÁFICA



3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Dermatofitoses

3.1.1. Agentes etiológicos – Fungos dermatófitos

Os dermatófitos, pertencentes à família *Arthrodermataceae*, caracterizam-se por serem fungos filamentosos, hialinos, septados, queratinofílicos e queratinolíticos, conhecidos agentes etiológicos das dermatofitoses (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; CAFARCHIA et al., 2013, WOREK et al., 2014). Esses fungos possuem um forte biotropismo por estruturas queratinizadas, como pele, pelos e unhas, sendo que a habilidade dermatofítica de ocasionar a micose está diretamente relacionada com essa dependência pela queratina (ANDOH; TAKAYAMA; KURAIISHI, 2014). A queratina é uma escleroproteína altamente polimerizada, constituída de cadeias polipeptídicas unidas por ligações sulfeto (S-S), as quais mantêm a forma tridimensional da molécula. Os dermatófitos possuem um sistema enzimático (produção de queratinases, nucleases, lipases e proteases) capaz de quebrar as ligações S-S, resultando em compostos que possuem o grupamento – SH (GIDDEY et al., 2007). Essa capacidade de secretar enzimas especializadas explicaria o fato de esses fungos infectarem somente os tecidos mais superficiais ricos em queratina, não tendo tanto poder invasor, excetuando-se os casos em que o hospedeiro apresenta alguma imunodeficiência (MEDEIROS et al., 2009; HOMBERG; MAGIN, 2014).

Em relação à ecologia, os dermatófitos podem ser antropofílicos, zoofílicos ou geofílicos, segundo seu habitat natural e preferência por hospedeiro (LACAZ et al., 2002; CAMPANHA; TASCA; SVIDZINSKI, 2009; KECHIA et al., 2014). Os fungos antropofílicos encontram-se restritos aos humanos e raramente infectam os animais (SINSKI; KELLEY, 1987; TAYLOR; GURR, 2014). Os zoofílicos são, primariamente, isolados de animais, mas podem causar a doença em humanos em contato com animais como gato, cão, cavalo, entre outros (SPIEWAK; SZOSTAK, 2000; TAYLOR; GURR, 2014). Os geofílicos têm como reservatório o solo e apenas ocasionalmente infectam o homem (GALLO et al., 2005). O estágio inicial de todos os dermatófitos consistia no estágio geofílico. Posteriormente, ocorreu a evolução de algumas espécies para o estágio zoofílico, atacando roedores e, posteriormente, animais domésticos. Finalmente algumas espécies avançaram para o estágio

antropofílico, ocasionando infecções fúngicas no ser humano (SPIEWAK; SZOSTAK, 2000). Evidencia-se que todos os três grupos incluem espécies que causam doenças em animais e seres humanos, sendo que transmissões de animais para outros animais, animais para humanos, de humanos para outros e do solo para animais e humanos são possíveis (CARTER, 1990; TAYLOR; GURR, 2014).

Quanto à distribuição, os dermatófitos são cosmopolitas, embora a real ocorrência seja influenciada por condições sociais e geoclimáticas. Os perfis epidemiológicos tornam-se assim variados, segundo fatores regionais, estacionais, de faixa etária, frequência de contato com animais, condições higiênico-sanitárias e exposição a locais públicos (AQUINO; CONSTANTE; BAKOS, 2007).

Clinicamente, os dermatófitos ocorrem em várias espécies animais e no homem, determinando de modo geral, lesões secas, arredondadas e, comumente, não pruriginosas, com áreas de alopecia, bordos eritematosos e vesiculares, que circunscrevem uma parte central descamativa, a qual se distribui focalmente na superfície cutânea (INDIRA et al., 2014). Os dermatófitos desenvolvem-se crescendo do centro da lesão para as bordas, ocasionando intensa descamação associada ou não à resposta inflamatória, resultante da atividade queratinolítica (SIDRIM; ROCHA, 2004); seus metabólitos difundem-se pelas células da epiderme causando reações de hipersensibilidade. As manifestações das lesões são decorrentes das relações do hospedeiro aos metabólitos do fungo, da virulência da espécie infectante e da localização anatômica (INDIRA et al., 2014).

Em cultura, os dermatófitos patogênicos produzem hifas septadas que se ramificam e formam o micélio com estruturas de reprodução assexuada, os conídios. Microscopicamente, esses conídios diferem entre as espécies dermatofíticas quanto à forma, ao tamanho, ao número e à disposição ao longo das hifas, sendo critérios essenciais para a identificação (SIDRIM; ROCHA, 2004; LEMSADDEK, 2008). A maioria das espécies de dermatófitos produz dois tipos de conídios: os grandes - macroconídios pluricelulares e os pequenos - microconídios unicelulares. A presença/ausência desses tipos de estruturas reprodutivas e o aspecto da parede das mesmas (rugosa ou lisa, espessa ou fina) são importantes para o correto reconhecimento das espécies, sempre se correlacionando com a macromorfologia e com o caso específico de cada paciente (LEMSADDEK, 2008; WOREK et al., 2014).

Os dermatófitos crescem em temperatura ótima que varia entre 25 °C e 35 °C, mas a maioria apresenta uma termotolerância que lhes permite um bom

crescimento, *in vitro*, a 37 °C (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; LEMSADDEK, 2008). A capacidade de adesão do fungo às células constitui um passo primordial na eventual invasão dos tecidos. Essa aptidão de aderir à superfície celular é atribuída à presença de glicoproteínas, contendo manana, na parede celular dermatofítica. Após a adesão à superfície celular os conídios germinam possibilitando o crescimento do fungo. Quanto maior a capacidade de aderência maior será a patogenicidade das espécies (LEMSADDEK, 2008; JEAN-PAU; BEAUVAIS, 2014). Paralelamente, a manana confere aos dermatófitos a possibilidade de evasão ao sistema imunitário do hospedeiro, como demonstrado por Campos e colaboradores (2006). Esses autores observaram uma inibição da fagocitose dos conídios de algumas espécies após adição deste constituinte da parede. Curiosamente, embora todas as espécies de dermatófitos invadam a pele, elas diferem entre si quanto à competência de invadir as unhas e os pelos. A razão para este tropismo diferenciado necessita ainda mais investigações, mas acredita-se que isso esteja relacionado com exigências nutricionais ou com a produção de enzimas indispensáveis para a ocorrência da infecção em diferentes estruturas queratinizadas (SIMPANYA, 2000).

As espécies fúngicas dermatofíticas são classificadas em três gêneros anamórficos (assexuados ou imperfeitos): *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*, que juntos compreendem mais de 40 espécies (KANE et al., 1997; CAFARCHIA et al., 2013; REFAI; EL-YAZID; EL-HARIRI, 2013), das quais 27 são patogênicas, 15 ocorrem no Brasil e 7 são comuns no Rio Grande do Sul (HAVLICOVA; CZAICA; FRIEDRICH, 2008). Esses gêneros anamórficos são os de grande relevância clínica, porém, a saber, os dermatófitos também apresentam estágio de reprodução sexuada (estado teleomórfico ou perfeito), nesse caso sendo agrupados no gênero *Arthroderma*. Data-se o início da ocorrência dos dermatófitos em meados do século XIX, quando foi isolado o *Achorion schoenleinii* (atualmente *Trichophyton schoenleinii*) de uma lesão no couro cabeludo de um paciente (CHABASSE, 2008). Dentre os dermatófitos de maior relevância clínica, ou seja, mais frequentemente relatados como causadores de infecção em humanos e animais cita-se *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum* (INDIRA et al., 2014), os quais apresentam distribuição geográfica bastante variável, dependendo das condições socioeconômicas, higiênicas e ambientais da população (SANTOS et al., 1997; FALAHATI et al., 2003; REZENDE et al., 2008, MAGAGNIN et al., 2011).

Microsporium canis (*M. canis*), espécie zoofílica de distribuição mundial, é tido como um dos principais agentes etiológicos de dermatofitose e o de maior prevalência em cães e gatos, sendo o responsável por cerca de 15% das infecções dermatofíticas em seres humanos, aproximadamente 70% em caninos e 98% em felinos (FRASER, 1996; MACIEL; VIANA, 2005; CARVALHO, 2010). A complexa epizootiologia do *M. canis* é de grande importância visto que os cães e os gatos são as maiores fontes de infecção desse dermatófito para os seres humanos (CARVALHO, 2010; MENDOZA et al., 2010). Infecções humanas são causadas pelo contato direto com um animal infectado, ou mais excepcionalmente, pelo contato com outros indivíduos colonizados com esse dermatófito. Os gatos são os principais veículos de *M. canis*, embora cachorros e outros animais possam ser responsáveis por episódios envolvendo humanos (CHERMETTE; FERREIRO; GUILLOT, 2008). *M. canis*, dentre os dermatófitos, é o responsável pela maioria dos casos de micoses em animais de estimação e o mais recorrente dermatófito zoofílico de humanos, em diversas áreas urbanas (MARTINÉZ et al., 2014).

Além disso, estudos epidemiológicos no Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Espírito Santo, São Paulo, África e continente Europeu, indicam que *M. canis* é o agente mais isolado nos casos de infecções dermatofíticas do couro cabeludo, sendo responsável por 67% dos casos de *tinea capitis* (BRILHANTE et al., 2000). Corroborando com isso, em um estudo realizado em Goiânia, foram examinadas 353 amostras de lesões do couro cabeludo das quais, 164 (46,4%) foram positivas para dermatófitos e destas, 117 (71,3%) para *M. canis* (SIMPANYA, 2000; DIAS et al., 2003).

Microsporium canis, quando cultivado, apresenta um crescimento com cerca de 6 a 10 dias. Macroscopicamente a colônia apresenta textura cotonosa, discreto relevo umbilicado, radiado e brancacento (Fig. 1 a). Já o reverso possui tonalidade amarelo-limão, que com o passar do tempo tende a tornar-se castanho por difusão do pigmento no meio (MARTINÉZ et al., 2014). O pleomorfismo é evidenciado com rapidez, apresentando-se como colônias cotonosas. Micromorfologicamente, há grande quantidade de macroconídios fusiformes (20 a 80 x 40 a 120 μm), de paredes grossas, rugosas, com um pico terminal pontiagudo característico e numerosas septações (até 15 septos) (Fig. 1 b) (QUINN et al., 2002). Quando presentes, os microconídios são sésseis e sem muito predativo diagnóstico.

Podem ainda ser observados clamidoconídios, órgãos nodulares e hifas pectinadas (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; MARTINÉZ et al., 2014).

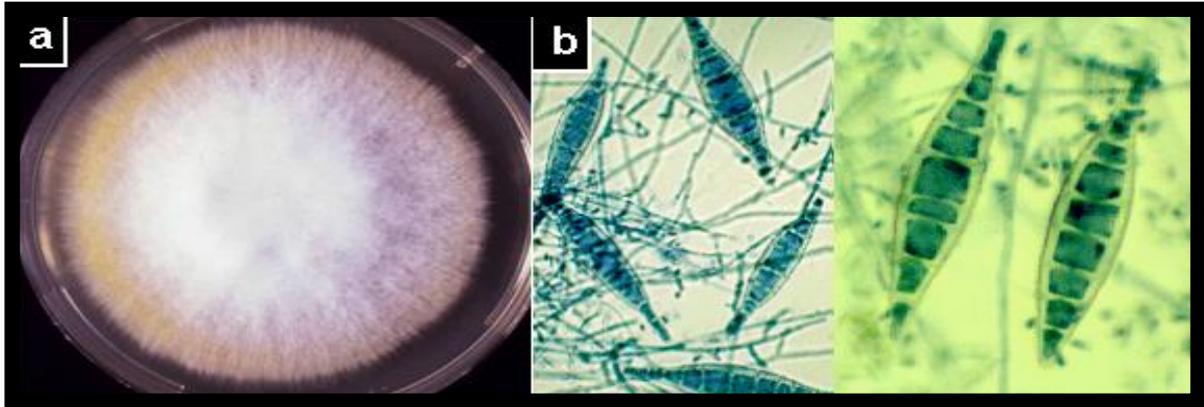


Figura 1. Imagens da macro (a) e micromorfologia (b) de *Microsporum canis* (FONTE: MYCOLOGY ONLINE – National Mycology Reference Centre, 2014).

Microsporum gypseum (*M. gypseum*), é um dermatófito geofílico, que infecta o homem através do contato com o solo contaminado, com ampla distribuição e disseminação no mundo todo. As lesões clínicas geralmente são encontradas em partes descobertas do corpo, com intensa reação inflamatória (POLILLI et al., 2011). A fluorescência à lâmpada de Wood não é observada com essa espécie de dermatófito e as unhas são raramente envolvidas em infecções por esse fungo. Crianças que brincam com areia e adultos que trabalham em contato direto com o solo podem infectar-se mais facilmente (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995). Sabe-se que essa espécie pode provocar dermatites graves e crônicas em pacientes com algum imunocomprometimento, como lúpus eritematoso sistêmico (YU; ZHOU; LIU, 2010) e também já se relatou na literatura infecções em recém-nascidos (AMBOOKEN; BINITHA; CHANDRAN, 2013).

Atualmente o que mais se observa nos relatos de caso é que o *M. gypseum* raramente ocasiona epidemias, os casos ocorrem mais isoladamente e dependem da virulência da cepa e da concentração do fungo no solo (WU et al., 2011; FENG et al., 2013). Quando comparado com as outras espécies dermatofíticas, as taxas de ocorrência de *M. gypseum* são menores, tendo uma maior prevalência infecções ocasionadas em indivíduos do sexo masculino (MELO-MONTEIRO et al., 2003). As lesões por essa espécie do solo ocorrem de forma preferencial na região genitocrural, por tratar-se de um ambiente de considerável maior umidade (MIRANDA et al., 1998; FENG et al., 2013).

Microsporium gypseum, cresce bem em Agar Sabouraud com cloranfenicol e cicloheximide, incubado à temperatura ambiente ou a 37 °C. Essa espécie tem um crescimento e maturação das colônias entre 3 a 7 dias. Macroscopicamente, as colônias caracterizam-se por serem planas, com bordas irregulares e extremamente pulverulentas, com pigmentação que varia a diversos tons de amarelo a acastanhado (Fig. 2 a). Tem uma forte tendência ao pleomorfismo e nessas situações, observam-se colônias cotonosas e brancacentas, constituídas apenas por hifas estéreis (LACAZ et al., 2002; OLIVEIRA, 2014). O reverso apresenta cores que variam do alaranjado ao marrom. Microscopicamente, observam-se para essa espécie, hifas hialinas septadas e macroconídios abundantes (7 a 15 x 25 a 60 µm), “em forma de canoa” e simétricos (Fig. 2 b), de parede celular fina, com até 6 septos e extremidades mais arredondadas e menos afiladas que as do *M. canis* (QUINN et al., 2002). Algumas linhagens ainda apresentam numerosos microconídios piriformes (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; SAENZ, 2001; OLIVEIRA, 2014).



Figura 2. Imagens da macro (a) e micromorfologia (b) de *Microsporium gypseum* (FONTE: MYCOLOGY ONLINE – National Mycology Reference Centre, 2014).

Trichophyton mentagrophytes (*T. mentagrophytes*) é difundido por todo mundo, sendo comum a ocorrência de infecções em humanos e animais. Trata-se de uma espécie que ocasiona lesões dermatofíticas com intermediária a intensa reação inflamatória. A espécie parasita um número elevado de animais (coelhos, cavalos, porcos, galinhas, etc.), razão pela qual a infecção em meios rurais é até mais frequente que no meio urbano (CALVO et al., 2002). A transmissão ao homem ocorre através de contato direto com o animal infectado, ocasionando infecção superficial da pele. As variações da espécie, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* e *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* podem apresentarem-se nas formas

antropofílicas e zoofílicas, respectivamente, acometendo o homem principalmente nas regiões do couro cabeludo, pés, mãos, unhas e regiões interdigitais, sendo diferenciadas por biologia molecular (SYMOENS et al., 2011). Quando essas lesões são provocadas por variações zoofílicas, apresentam maior intensidade inflamatória (OYECA, 2000).

Em relação à importância clínica, *T. mentagrophytes* é a segunda espécie dermatofítica mais isolada nos casos de dermatofitose em humanos, perdendo apenas para *T. rubrum*, embora haja atualmente uma tendência de diminuição do número de isolados clínicos dessa espécie (LEE et al., 2014). Na Nigéria, *T. mentagrophytes* já foi isolado de casos de infecções dos pés de trabalhadores de uma fábrica de cimento (GENTLES; HOLMES, 1957). Em Amsterdã, foi isolado de operários industriais que tomavam banho em ambientes comuns (NIEBOER et al., 1987). No Reino Unido, de 346 espécimes clínicos de dermatofitose analisados, em 224 identificou-se a presença de *T. mentagrophytes*. Em 1996 na Itália, observou-se que de 17 casos de infecção dermatofítica no couro cabeludo, 4 envolveram essa espécie (ASTE; PAUL; BIGGIO, 1996). *T. mentagrophytes* é também reconhecidamente um agente envolvido em infecções de localização cutânea rara, como foi o caso em 1993, de lesão do tipo quérion (lesão de intensa supuração e inflamação) vulvar, em uma paciente de 43 anos (PINTO et al., 1993). A particularidade desse processo está no fato de que quérion raramente ocorre na vulva, sendo comumente relatado casos no couro cabeludo, sobrancelha e barba (PINTO et al., 1993). No Brasil, comumente ocorrem casos de dermatofitose envolvendo *T. mentagrophytes*, em humanos (SILVA et al., 2012) e animais (PEREIRA et al., 2004). No RS, entre os meses de novembro de 2010 a agosto de 2011, foram analisados laudos de pacientes submetidos a exames micológicos, com suspeita de micose superficial, cutânea e profunda, encaminhados a um laboratório no município de Novo Hamburgo, da Região do Vale dos Sinos. Dos resultados positivos para micoses superficiais e cutâneas, envolvendo pele e unha, a maioria (38,70%) foi devido ao *T. mentagrophytes*, sendo que as demais espécies relacionadas com esse tipo de micose, em ordem de ocorrência, foram *Candida* spp., *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton interdigitale* (ROCHA; VIEIRA, 2014).

O crescimento de *T. mentagrophytes* é relativamente rápido, com amadurecimento entre 3-6 dias. Numerosas variações na morfologia da colônia

decorrem em virtude das diferenças que compõem o complexo *T. mentagrophytes*. Em Agar Sabouraud Dextrose (ASD), a forma antropofílica, mais comum, (*T. mentagrophytes* var. *interdigitale*) cresce com colônias sobre-elevadas que se estendem rapidamente, de coloração branca a creme e superfície aveludada-algodonosa, mas também pode haver zonas mais lisas e granulares, sendo que o reverso é pigmentado de amarelo a marrom, escurecendo com o tempo (Fig. 3 a) (SINSKI; KELLEY, 1987; SAENZ, 2001; SIDRIM; ROCHA, 2004; KAUFMAN et al., 2005; OLIVEIRA, 2014). Em Agar Batata, o micélio aéreo é esparso com numerosos conídios. Para isolados zoofílicos (*T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*), no ASD, observam-se colônias geralmente planas, de coloração branca a creme e superfície mais granular; o reverso apresenta pigmento amarronzado ou marrom-acastanhado (OLIVEIRA, 2014). Microscopicamente, o fungo possui hifas hialinas septadas, raros macroconídios, que são longos (com dimensões em torno de 20-50 µm), chaturoides e de parede fina e lisa. A principal característica micromorfológica de *T. mentagrophytes* é a presença de microconídios globosos e agrupados nas ramificações das hifas, formando os denominados “acladium”, cujo arranjo lembra um cacho de uvas (Fig. 3 b) (KONEMAN, 2006). Tipicamente esses microconídios possuem a forma de “lágrima”, por vezes são mais alargados e as hifas, de modo frequente, podem ficar em espiral (“zarcilos”) (Fig. 3) (KAUFMAN et al., 2005; COSTA 2008; OLIVEIRA, 2014). As variações do complexo são fenotipicamente muito semelhantes e ambas positivas no teste da urease, por isso para uma diferenciação precisa faz-se uso de técnicas moleculares (SYMOENS et al., 2011).

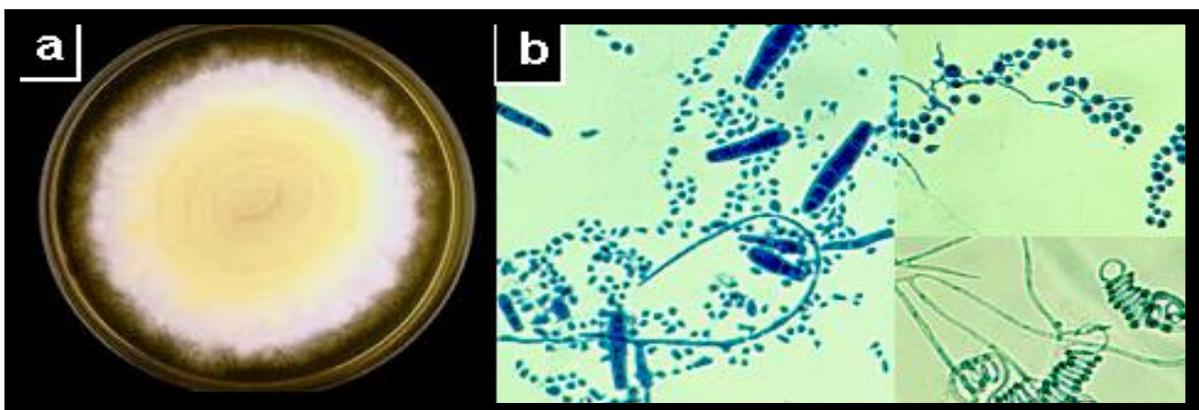


Figura 3. Imagens da macro (a) e micromorfologia (b) de *Trichophyton mentagrophytes* (FONTE: MYCOLOGY ONLINE – National Mycology Reference Centre, 2014).

Trichophyton rubrum (*T. rubrum*) é uma espécie antropofílica cosmopolita, responsável por cerca de 70% de todas as infecções por dermatófitos, sendo o agente mais isolado, especialmente de onicomicoses (WOLFF; JOHNSON; SAAVEDRA, 2013). A altíssima prevalência está correlacionada com o fato de essa espécie ser geralmente refratária ao tratamento usual, devido sua grande adaptação ao hospedeiro humano - daí sua maior facilidade em burlar as defesas inatas do paciente e permanecer como uma infecção residual, com eventuais complicações clínicas e sintomas mais severos (MUKHERJEE et al., 2003; SIDRIM; ROCHA, 2004). Essa espécie infecta cabelo, pele e unhas principalmente de adultos, mas pode ocorrer também em crianças. O que se observa na literatura, é que sem dúvidas, é o mais comum e largamente distribuído dermatófito que acomete o homem. Trabalhos desenvolvidos por pesquisadores da América do Sul e do Norte, além da Europa, mencionam esse fungo como sendo um dos mais comumente isolados nos laboratórios dessas regiões e com reconhecida resistência à terapêutica tópica. No Brasil, *T. rubrum* também é relatado como sendo o dermatófito mais frequentemente observado na clínica (BAEZA et al., 2004; AQUINO; CONSTANTE; BAKOS, 2007; DAMÁZIO et al., 2007; REZENDE et al., 2008).

Na Alemanha, *T. rubrum* já foi a espécie isolada em 85% dos casos de dermatofitose (SEEBACHER; BOUCHARA; MIGNON, 2008), na Finlândia em 66% dos casos (LEHENKARI; SILVENNOINEN-KASSINEN, 1995), na Rússia em 70% (KHALDIN; SERGEYEV; IZYUMOVA, 2005) e na China em 44% (TAO-XIANG et al., 2005). No Brasil, em um estudo em Florianópolis, foram avaliados aspectos epidemiológicos das micoses que mais acometem pacientes atendidos no Serviço de Dermatologia do Hospital Universitário da cidade, constatando-se que as infecções fúngicas mais frequentes foram as dermatofitoses (22,1% dos casos), sendo que *T. rubrum* foi o isolado mais frequente (52,3%), seguido de *T. mentagrophytes*, observado em 31,8% dos casos (COELHO et al., 2005). Essas altas percentagens evidenciadas nos mais variados trabalhos corroboram com o documentado para os agentes etiológicos das dermatofitoses, de que *T. rubrum* é de fato o principal dermatófito envolvido na maioria dos casos, no passado e também atualmente (HAVLICOVA; CZAIIKA; FRIEDRICH, 2008; THOMAS et al., 2010; GULCAN et al., 2011; LAM et al., 2014).

Trichophyton rubrum possui uma taxa de crescimento relativamente lenta em Agar Sabouraud. As colônias em seu crescimento primário são geralmente cotonosas e brancas, tornando-se aveludadas posteriormente (Fig. 4 a). O reverso da colônia apresenta pigmentação de coloração avermelhada ou vermelho-púrpura, que se difunde no meio de cultivo; melhor evidenciado em Agar Batata Dextrose (ABD) (OLIVEIRA, 2014). Em certas ocasiões, a coloração é inicialmente amarelada, escurecendo gradativamente até tornar-se vermelha. As colônias possuem pregas radiais, formando uma pequena saliência central. Na micromorfologia, observam-se hifas hialinas, septadas, com microconídios em forma de lágrima ou gota, dispostos ao longo das mesmas ou em cachos (Fig. 4 b) (OLIVEIRA, 2014). Os macroconídios são raros, produzidos geralmente por amostras mais granulosas, esporulantes, formados no final das hifas e dispostos isoladamente ou em grupo. Eles são longos, estreitos, com bordas laterais bem paralelas e paredes finas (HARVEY; CHAMPE; FISHER, 2008). Muitas vezes a identificação é difícil de ser feita apenas com esses dados, mesmo para micologistas experientes, por isso em alguns casos faz-se o diagnóstico diferencial, como a capacidade que o *T. rubrum* tem de produzir pigmento em Agar fubá a 1%, teste de perfuração do pelo e urease negativos (SINSKI; KELLEY, 1987; SAENZ, 2001; OLIVEIRA, 2014).

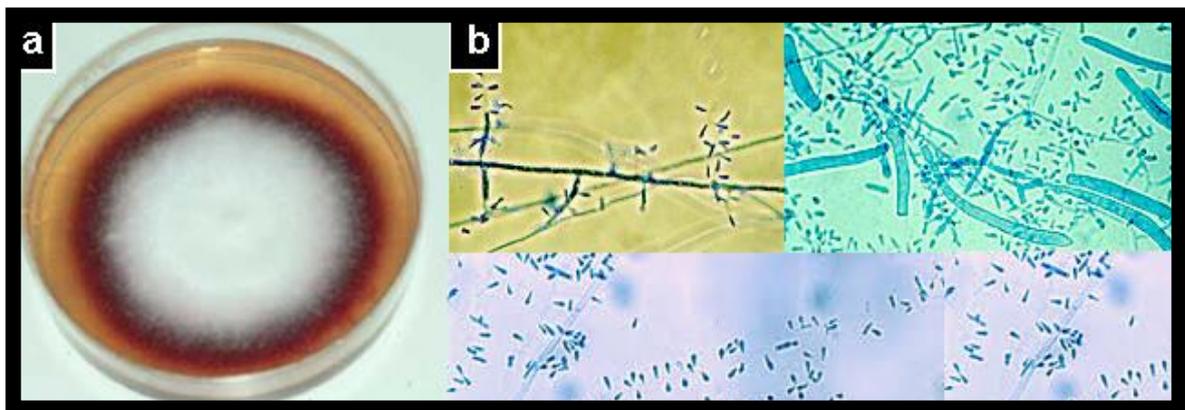


Figura 4. Imagens da macro (a) e micromorfologia (b) de *Trichophyton rubrum* (FONTE: MYCOLOGY ONLINE – National Mycology Reference Centre, 2014).

3.1.2. Formas clínicas

Muitos dermatófitos ocasionam síndromes fúngicas bem definidas e uma espécie pode estar envolvida em diferentes formas clínicas da micose, dependendo do sítio anatômico envolvido. Sendo assim, as infecções dermatofíticas podem ser classificadas clinicamente de acordo com as localizações anatômicas das lesões,

utilizando a denominação *tinea* (do latim *tinea* = verme ou traça) para todas as dermatofitoses, seguida do sítio anatômico onde se localiza a infecção, também em latim (REFAI; EL-YAZID; EL-HARIRI, 2013). As modalidades dermatofíticas mais relevantes são: *tinea capitis* (couro cabeludo), *tinea corporis* (corpo), *tinea cruris* (grandes pregas), *tinea unguium* (unha), *tinea barbae* (barba), *tinea manuum* (mãos) e *tinea pedis* (pés) (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; SEEBACHER; BOUCHARA; MIGNON, 2008; DIEGO, 2011; KALINOWSKA, 2012; REFAI; EL-YAZID; EL-HARIRI, 2013). Em pacientes imunocompetentes, as lesões dermatofíticas, apresentadas nas diferentes formas clínicas, não são graves em termos de mortalidade, porém ocasionam consequências clínicas significativas, com lesões cutâneas crônicas de difícil tratamento, afetando a qualidade de vida das pessoas, que podem sofrer até mesmo discriminação social (PIRES et al., 2014).

Tinea capitis (TCa) ou tinha do couro cabeludo (Fig. 5 a) acomete essa região, sobrancelhas e cílios, afetando principalmente crianças em idade escolar, sendo pouco frequente em adultos (KOCH; ENGLISH, 2014). Essa forma clínica de dermatofitose caracteriza-se por lesões que variam de forma branda e descamativa a uma forma mais eritematosa, acompanhada de alopecia, e que pode tornar-se severamente inflamada, formando lesões ulceradas profundas (Fig. 5 a). TCa é causada principalmente por fungos dos gêneros *Microsporum* e *Trichophyton* (DIEGO, 2011; FERNANDES et al., 2013).

As tinhas do couro cabeludo podem apresentar-se sob três formas: (a) forma favosa, com crostas compostas de restos celulares epiteliais e massas densas de hifas, na qual inicialmente há foliculite com conseqüente lesão do folículo piloso e evolução para alopecia permanente; (b) forma tonsurante, mais comum, caracterizada pela presença de uma ou mais lesões circulares e descamativas, podendo ainda se diferenciar em dois tipos – microspórica (lesões únicas, grandes e arredondadas) e tricofícia (lesões múltiplas com intensa descamação) e (c) forma de quérion, com quadro inflamatório intenso (MITEVA; TOSTI, 2012; FERNANDES et al., 2013). Em função dos agentes etiológicos, as manifestações clínicas das lesões também podem variar. *M. canis* geralmente é responsável por lesões tonsurantes do tipo microspóricas, com superfície escamosa; *T. tonsurans* e *T. violaceum* ocasionam lesões do tipo tricofícias, a partir das quais é possível a visualização de pontos negros resultantes da invaginação do cabelo parasitado no folículo piloso (NERI et al., 2014); *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* e *T. verrucosum* provocam

quadros agudos com intensa reação inflamatória e lesões na forma de quérion com microabscessos e *T. schoenleinii* causa escútula fávica, com crostas de coloração amarelada, extremamente aderentes ao couro cabeludo (DIEGO, 2011; LACAZ et al., 2002; KOCH; ENGLISH, 2014).



Figura 5. Imagens de lesões características das distintas formas clínicas de dermatofitose: (a) *tinea capitis* (couro cabeludo), (b) *tinea corporis* (corpo), (c) *tinea cruris* (grandes pregas), (d) *tinea unguium* (unha), (e) *tinea barbae* (barba), (f) *tinea manuum* (mãos) e (g) *tinea pedis* (pés) (FONTE: MYCOLOGY ONLINE – National Mycology Reference Centre; DOCTOR FUNGUS, 2014).

Além disso, em tinhas do couro cabeludo os dermatófitos podem parasitar os pelos em três padrões principais: (a) endotrix (artroconídios localizados no interior dos fios, comumente ocasionado pelas espécies *T. tonsurans* e *T. violaceum*), (b) ectotrix (artroconídios em torno do eixo do cabelo, como observado em *M. canis* e *T. mentagrophytes*) e (c) favus (hifas e espaços de ar no interior da haste capilar, como ocorre para *T. schoenleinii*) (GUPTA et al., 1999; KOCH; ENGLISH, 2014).

Em relação à epidemiologia, *tinea capitis* é uma forma clínica da dermatofitose de preocupação e ocorrência mundial, sendo considerado um problema de saúde pública na África (KECHIA et al., 2014). Em um estudo próximo a Nigéria, com 4.601 crianças, entre 10 a 16 anos, 377 ($\approx 8,2\%$) apresentavam lesões no couro cabeludo típicas de TCa. A proporção de meninos (63,7%) com TCa era maior do que em meninas (36,3%), sendo que a maioria das manifestações incluíam placas de alopecia. O isolado mais prevalente foi *T. soudanense* (56,8%), seguido por *T. rubrum* (29,2%) (KECHIA et al., 2014). Na Tunísia, 378 pacientes foram diagnosticados com TCa, desses 367 eram crianças e 11 adultos. Um percentual de $\approx 64\%$ estava relacionado com lesões microspóricas, sendo *M. canis* o agente mais isolado nesses casos (99,14%) e $\approx 36\%$ manifestavam lesões do tipo tricofícias, sendo *T. violaceum* o principal responsável por praticamente todos os casos (98,48%) (LITAIEM et al., 2014). Na Argélia, foi realizado um estudo retrospectivo dos casos de TCa, durante três anos (2010 a 2013), sendo verificado que para um total de 213 amostras de cabelo, 133 foram positivas (exame direto ou cultura) para TCa. A média de incidência foi de 44 casos por ano, observando-se que 91% dos pacientes tinham menos de 12 anos de idade. Três espécies de dermatófitos foram isoladas desses casos: *T. violaceum* (66%), *M. canis* (32,5%) e *T. mentagrophytes* (1,5%) (BENDJABALLAH-LALIAM; DJAZER, 2014). Embora, a incidência de TCa seja evidentemente maior em crianças e adolescentes, não só em regiões africanas, como em outros países também (REBOLLO; LÓPEZ-BARCENAS; ARENAS, 2008; ARENAS et al., 2010; DEL BOZ-GONZÁLEZ, 2012), já se relataram pequenos surtos dessa dermatofitose em pacientes idosos, com grave acometimento do couro cabeludo (HILLARY; SUYS, 2014). A TCa é considerada uma das dermatofitoses de maior relevância clínica internacionalmente, tanto que em 2014, a Associação Britânica de Dermatologistas estabeleceu diretrizes padrões para a detecção e principais tratamentos para esse tipo de micose (FULLER et al., 2014).

No Brasil, *T. tonsurans* e *M. canis* são os principais agentes de tinha do couro cabeludo e as crianças pré-púberes representam o grupo demográfico mais acometido por essa micose (SOARES et al., 2003; REBOLLO; LÓPEZ-BARCENAS; ARENAS, 2008). Constatou-se uma microepidemia de TCa em 11 crianças de uma creche pública de Vitória (ES), entre 2 e 6 anos de idade, 61% do sexo masculino.

Apresentavam lesões arredondadas, escamosas, tonsurantes, grandes e únicas, nas regiões frontal, occipital, parietal, e, em dois casos, o couro cabeludo estava difusamente acometido. Os exames micológicos diretos evidenciaram parasitismo do tipo ectotrix, e 45,5% das culturas foram positivas para *M. canis*, justificando-se esse fato pelo histórico de contato das crianças da creche com cães de localidades próximas (GÜRTLER; DINIZ; NICCHIO, 2005). Em Santa Catarina, relatou-se um caso de TCa por *T. violaceum* em uma mulher com 65 anos de idade, com várias placas de alopecia e prurido. O isolado foi identificado como *T. violaceum* por critérios macro e micromorfológicos, bem como bioquímicos, mediante a positividade na prova da hidrólise da ureia (RODRIGUES et al., 2008). No RS, em 1984, Bassanesi e colaboradores (1984) relataram o primeiro caso de TCa por *T. violaceum* em adolescente residente em Alvorada. Posteriormente, em 1988, descreveu-se a ocorrência de uma microepidemia em cinco crianças e um adolescente no litoral norte do estado (BASSANESI et al., 1988); e em 1994, constatou-se um caso de TCa em uma criança procedente de Santiago (LOPES et al., 1994), sendo esses os estudos epidemiológicos de TCa mais específicos para a região sul do Brasil.

Tinea corporis (TCo) ou tinha da pele glabra (Fig. 5 b) acomete principalmente as áreas dos ombros, tronco, braços e de modo mais ocasional a face, sendo frequentemente relatada em crianças (HAWKINS; SMIDT, 2014). As lesões se manifestam geralmente com aspecto anelar, sob a forma de pequenos eritemas de contorno delimitado (Fig. 5 b) (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; HAVLICOVA; CZAICA; FRIEDRICH, 2008; DIEGO, 2011). Em certos casos, com bordas elevadas, vesiculosas ou até mesmo pustulosas, com formação de granulomas (REFAI; EL-YAZID; EL-HARIRI, 2013). Essa forma típica anelar é a mais frequente, caracterizada por placas extremamente arredondadas, com crescimento centrífugo, havendo tendência à cura central (DIEGO, 2011; KALINOWSKA, 2012). Os principais fungos agentes de tais dermatofitoses pertencem às várias espécies de *Microsporum* e *Trichophyton* (HAVLICOVA; CZAICA; FRIEDRICH, 2008). O dermatófito mais comumente isolado em todo o mundo nesses casos é o *T. rubrum*, seguido por *T. mentagrophytes* (DIEGO, 2011; HAWKINS; SMIDT, 2014). Há variantes crônicas de *tinea corporis* como “granuloma de majocchi”, com vesículas pápulo-eritematosas, principalmente ocorrendo nos membros inferiores das mulheres pós-depilação e *tinea imbricata*, caracterizada por anéis concêntricos por

todo corpo, a qual ocorre endemicamente entre os indígenas de certas ilhas do oceano pacífico, das Américas do Sul-Central e sudeste da Ásia (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; LACAZ et al., 2002), tendo *T. concentricum* como agente etiológico antropofílico (PIHET et al., 2008). Juntamente com a *tinea capitis*, a TCo é considerada uma das dermatofitoses mais prevalentes (DEGREEF, 2008; REFAI; EL-YAZID; EL-HARIRI, 2013).

Epidemiologicamente, na Índia a TCo é a mais comum dermatofitose observada, sendo mais frequente em pacientes do sexo masculino, seguida por *tinea cruris* (INDIRA et al., 2014). O principal agente etiológico envolvido é *T. rubrum* e as lesões mais comumente observadas incluem placas anulares eritematosas (INDIRA et al., 2014). Na França, recentemente, identificou-se um caso de TCo em um paciente adulto, com lesões extensas no tronco e membros inferiores (CINOTTI et al., 2014), bem como na Espanha em uma paciente de 21 anos, com lesão característica de TCo na região interescapular, isolando-se desse caso *M. canis* (LÓPEZ-VILLAESCUSA et al., 2014). Na Alemanha, já se relatou um surto de TCo por *T. tonsurans* em 46 crianças e adolescentes, com idade entre 7 a 17 anos (EL FARI et al., 2000). Nesse mesmo país, em 2007, evidenciou-se 5 casos de TCo com lesões atípicas, que incluíam até mesmo a formação de bolhas na pele (ZIEMER et al., 2007).

No Brasil, 137 crianças menores de 12 anos e clinicamente diagnosticadas com tinhas, foram investigadas prospectivamente no Instituto de Pediatria, no Rio de Janeiro, no período de 1994 a 1999. Foram submetidas ao exame micológico do raspado de pele e unhas, pelos e pus das lesões. Meninos na faixa etária de 2 a 12 anos foram os mais acometidos; *tinea capitis* (78 casos) por *M. canis* foi a mais frequente e *tinea corporis* (43 casos) por *T. rubrum* foi a segunda forma clínica mais observada nesse estudo (FERNANDES; AKITI; BARREIROS, 2001). Em São Paulo, entre os anos de 1992 e 2002, TCo foi a forma clínica dermatofítica de maior ocorrência nesse estado, tendo como principal agente etiológico *T. rubrum* (CHIMELLI et al., 2003). No RS, em um levantamento epidemiológico atual de infecções fúngicas de pacientes atendidos em um laboratório da região do Vale dos Sinos, relatou-se que o local de maior identificação de fungos dermatófitos foi a pele glabra, sendo *T. mentagrophytes* o principal dermatófito envolvido na maioria dos casos de TCo (ROCHA; VIEIRA, 2014).

Tinea cruris (TCr) ou tinha inguinal (Fig. 5 c) envolve as regiões perineais, inguinais e perianais, de forma aguda ou crônica, sendo mais frequente em adultos (KALINOWSKA, 2012). As lesões se manifestam sob a forma de placas avermelhadas, descamativas, marginadas, bilaterais ou unilaterais com sensação de queimação e prurido intenso nas áreas afetadas, chamadas de “eczema marginado de hebra” (Fig. 5 c) (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; DIEGO, 2011). As margens das lesões são circinadas, elevadas, ligeiramente papulosas e algumas vezes acompanhadas de vesículas. As principais espécies envolvidas são *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* e *E. floccosum*. Encontra-se em todas as partes do mundo, mas é mais prevalente nas regiões tropicais, onde a umidade favorece a colonização do dermatófito (KALINOWSKA, 2012). Acomete mais comumente os homens, e dificilmente envolve as mulheres, exceto quando ocorre transmissão por um contato íntimo ou fômite contaminado (LACAZ et al., 2002). Os fatores predisponentes incluem transpiração, umidade, roupas apertadas que irritam a pele, diabetes, obesidade, entre outros. A TCr pode tomar proporções epidêmicas em times de esporte, internatos, tropas militares, etc. Em tais circunstâncias as tolhas e roupas de cama compartilhadas, podem servir como agente de disseminação da micose (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; DIEGO, 2011).

Na Índia, TCr é a segunda forma clínica de maior prevalência, sendo que *T. rubrum* é o dermatófito isolado da maioria dos casos (INDIRA et al., 2014). Na Espanha, em 2008, descreveu-se casos de TCr em 2 pacientes oriundos da Nigéria, mas que moravam na Espanha, com lesões nos glúteos, ocasionada por uma nova variedade de *T. rubrum* - *T. rubrum* var. *raubitschekii*. Esse estudo é um dos primeiros relatos de TCr na Espanha (MOYANO et al., 2008). No Brasil, um estudo a fim de determinar a epidemiologia de TCr em São Paulo, foi conduzido de abril de 1995 a março de 1997. Um total de 2000 pacientes foram investigados, dos quais 105 foram selecionados por apresentarem algum sintoma condizente com TCr. A cultura foi positiva para os dermatófitos em ≈ 63% dos casos, com vesículas eritematosas frequentemente relatadas na anamnese dos indivíduos acometidos. *T. rubrum* foi a espécie mais prevalente (90% dos casos), seguido por *T. tonsurans* (6%) e *T. mentagrophytes* (4%) (TAVARES; ALCHORNE; FISCHMAN, 2000).

Tinea unguium (TUn), tinha das unhas ou onicomicose dermatofítica (Fig. 5 d) é uma invasão da lâmina ungueal ocasionada por dermatófitos, considerada uma das micoses de diagnóstico e tratamento mais difíceis (DANIEL; JELLINEK, 2010). A

maioria dos casos envolve espécies antropofílicas e raramente geofílicas (KALINOWSKA, 2012). As unhas ficam extremamente frágeis, podendo ocorrer o aparecimento de sulcos, fraturas e calos, com aspecto geralmente amarelado, mas também podem ficar arroxeadas ou esbranquiçadas (Fig. 5 d). As unhas dos pés são mais frequentemente infectadas por dermatófitos do que as unhas das mãos, sendo isso resultado de uma possível coinfeção dermatofítica nos pés (*tinea pedis*) (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; KALINOWSKA, 2012).

O comprometimento das unhas na TUn pode ser subungueal (distal e/ou proximal) ou superficial (leuconíquia micótica/tricofítica/branca), sendo *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* as espécies mais frequentemente implicadas (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; DIEGO, 2011). A forma subungueal distal (Fig. 6 a) se inicia no bordo livre da unha, desloca a lâmina ungueal, podendo evidenciar-se hiperqueratose na maioria dos casos. Na forma subungueal proximal (Fig. 6 b), a lâmina se desloca a partir da borda proximal, com acúmulo de detritos córneos. Nas formas subungueais, com a progressão da lesão há destruição total da lâmina ungueal (REFAI; EL-YAZID; EL-HARIRI, 2013). A forma superficial (Fig. 6 c) é caracterizada por pontos de cor branca em qualquer parte da lâmina ungueal, podendo acometer completamente toda a unha (WELSH; VERA-CABRERA; WELSH, 2010; DIEGO, 2011). Esse tipo de lesão é geralmente assintomática, visto que o fungo estando mais superficialmente localizado na unha, não entra em contato com os tecidos, não havendo resposta inflamatória (DIEGO, 2011).

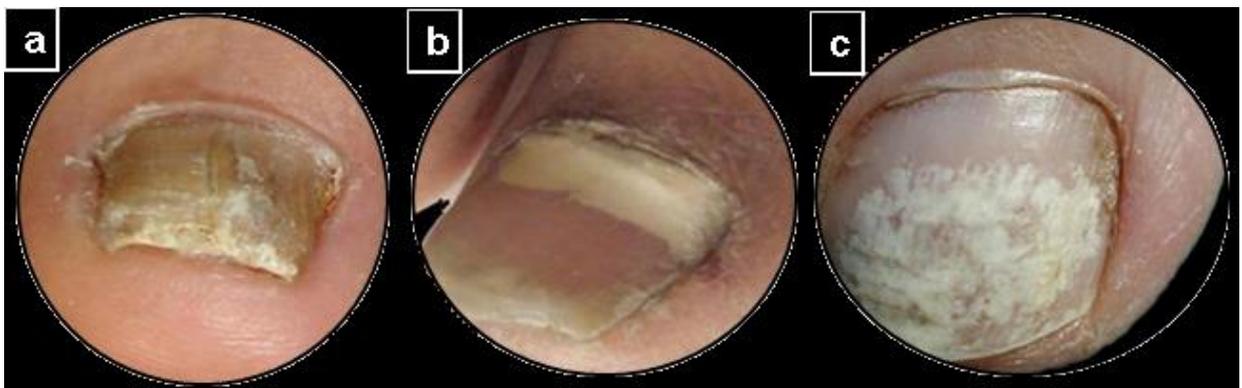


Figura 6. Imagens dos tipos de comprometimento ungueal nas onicomicoses dermatofíticas: (a) forma subungueal distal (b) forma subungueal proximal (c) forma superficial (leuconíquia micótica/tricofítica/branca) (FONTE: adaptado de WELSH; VERA-CABRERA; WELSH, 2010).

Digno de nota, as onicomicoses em geral, conceitualmente, infecções fúngicas das unhas, podem ser causadas por agentes outros que não somente dermatófitos, tais como *Candida albicans*, *Scytalidium* spp., *Geotrichum candidum*, *Aspergillus* spp., *Trichosporon* spp. e *Scopulariopsis brevicaulis*, porém vários estudos citam os fungos dermatofíticos como os principais envolvidos na totalidade das onicopatias micóticas (80% dos casos), seguidos pelas leveduras (5 a 17%) e por fungos filamentosos não dermatofíticos (2 a 12%) (HANEKE, 1991; KENNA; ELEWSKI, 1996; PERCA et al., 2000; ARAÚJO et al., 2003). As onicomicoses dermatofíticas figuram entre as mais prevalentes formas clínicas de dermatofitose, principalmente quando comparadas com as *tineas corporis*, *pedis* e *capitis* (PIRES et al., 2014). Tem-se inclusive testes específicos, mais recentemente, para detecção de dermatófitos nos casos de TUn, tal é a elevada ocorrência desse tipo de fungo nas onicomicoses (TSUNEMI et al., 2014).

Dados epidemiológicos indicam que a incidência de TUn aumenta com a idade, chegando a atingir 30% de indivíduos com mais de 60 anos (WELSH; VERA-CABRERA; WELSH, 2010) e sendo pouquíssimo frequente em crianças (FERNANDES; AKITI; BARREIROS, 2001). Quanto aos dermatófitos mais envolvidos citam-se *T. rubrum* (60%), *T. mentagrophytes* (20%) e *E. floccosum* (10%) (HAY, 2005; WELSH; VERA-CABRERA; WELSH, 2010). No Irã, realizou-se um estudo, entre 1994 e 2004, com 590 pacientes com alguma onicopatia (354 do sexo feminino e 236 do sexo masculino), constatando-se TUn em 41 casos (7%), dentre esses, 66% ocasionado por dermatófitos zoofílicos, 31% por antropofílicos e 3% por geofílicos (KAZEMI, 2007).

No Brasil, no período de janeiro de 1998 a dezembro de 2000, foram realizados exames micológicos (direto e cultura), de unhas de 2271 pacientes originários da cidade do Rio de Janeiro, com provável diagnóstico clínico de onicomicose. Do total de indivíduos, foi diagnosticado onicomicose em 400 pacientes estudados, com as leveduras do gênero *Candida* (49%) como os agentes etiológicos mais frequentes nas unhas das mãos e em mulheres (83,16%). Em contraste, os dermatófitos foram mais isolados das unhas dos pés e em homens, resultando num total de 186 indivíduos com envolvimento dermatofítico (46,5%) (ARAÚJO et al., 2003). Na região de Santa Maria (RS), as onicomicoses de origem dermatofítica já representaram um percentual de $\approx 70\%$ em relação ao total das

infecções nas unhas, sendo *T. rubrum* o principal agente etiológico (\approx 51% dos casos) (LOPES et al., 1999a).

Tinea barbae (TBa) ou tinha da barba (Fig. 5 e) afeta regiões pilosas do pescoço e da face e, portanto é mais restrita a homens adultos (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; DIEGO, 2011). Apresenta dois quadros clínicos distintos: (a) o tipo leve-superficial, no qual as bordas das lesões são vesículo-pustulares (Fig. 5 e) e a reação do hospedeiro é menos intensa, embora a alopecia possa se desenvolver na região central da lesão e (b) o tipo mais profundo e pustular, com formação de pústulas foliculares e crostas, que podem resultar na formação de nódulos, semelhante clinicamente à foliculite bacteriana (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; DIEGO, 2011). As lesões podem apresentar intensa reação inflamatória dos folículos pilosos presentes nas regiões afetadas, por a etiologia estar relacionada com dermatófitos zoofílicos, especialmente os do gênero *Trichophyton* (LACAZ et al., 2002); as lesões de TBa podem ser acompanhadas de muita coceira, sendo mais comumente observadas em agricultores (KALINOWSKA, 2012; REFAI; EL-YAZID; EL-HARIRI, 2013).

Na África, TBa é relativamente bem comum (ELLABIB; KHALIFA; KAVANAGH, 2002). Nos EUA, em 2002, foi diagnosticado um caso de TBa em um paciente de 22 anos, ocasionado por uma espécie do gênero *Trichophyton*, relatando-se que provavelmente a infecção micótica foi adquirida da gata do paciente (TROTHA et al., 2003). No Brasil, em um estudo na Paraíba, verificou-se a incidência de TBa em 1% da população (LIMA, 1996), não havendo na literatura nacional, inclusive no RS, estudos epidemiológicos mais atuais.

Tinea manuum (TMa) ou tinha das mãos (Fig. 5 f) refere-se às infecções por dermatófitos nas superfícies planares das mãos e regiões interdigitais. Quanto às manifestações clínicas, há amplo comprometimento palmar, geralmente apresenta hiperqueratose unilateral difusa, lesões esfoliativas, eritematosas ou papulosas discretas (Fig. 5 f) (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; DIEGO, 2011). As espécies mais frequentemente relacionadas são antropofílicas - *T. mentagrophytes* e *T. rubrum* (KALINOWSKA, 2012).

Na Itália, em 2003, relatou-se um caso de TMa bolhosa em um agricultor de 36 anos. A lesão, na mão direita, assemelhava-se à dermatite de contato, isolando-se desse caso *T. verrucosum* (ASTE; PAU; ASTE, 2003). Em 2004, na Espanha, descreveu-se dois casos de TMa com intensa inflamação em crianças, que haviam

feito previamente uso de corticoides (FLORES et al., 2004). Na China, é considerada uma micose bem comum. Em 2013, um estudo epidemiológico foi realizado com pacientes chineses, descrevendo-se 280 casos de TMa, sendo que desse total ≈ 85% apresentava coinfeção por *tinea pedis*. Constatou-se que em 90% dos casos a espécie prevalente foi *T. rubrum*, seguida por *E. floccosum*, *T. violaceum* e *T. mentagrophytes* (ZHAN et al., 2013). No Brasil, em SP, entre 1992 e 2002, TMa teve um percentual de ocorrência de ≈ 2%, sendo *T. rubrum* o dermatófito mais prevalente (CHIMELLI et al., 2003). No RS, de abril de 2000 a abril de 2001, 208 pacientes transplantados renais com algum tipo de micose, foram avaliados no Serviço de Dermatologia da UFRGS, Complexo Hospitalar Santa Casa, quanto ao tipo de infecção micótica mais prevalente. As infecções fúngicas superficiais foram as mais frequentes, perfazendo 40,9% de todas as dermatoses. A pitíriase versicolor foi encontrada em 37 pacientes (17,8%), apresentando-se geralmente de forma disseminada, com grande número de lesões. As dermatofitoses ocorreram em 15 pacientes (7,3%) nas seguintes formas clínicas: *tinea corporis* em sete pacientes (3,4%), *tinea pedis* em cinco (2,4%), *tinea cruris* em dois (1%) e *tinea manuum* em um (0,5%) (VETTORATO et al., 2003).

Tinea pedis (TPe) ou tinha dos pés (Fig. 5 g), popularmente conhecida como “pé de atleta”, é uma infecção dermatofítica que envolve particularmente as solas e os dedos dos pés (REFAI; EL-YAZID; EL-HARIRI, 2013). Considera-se uma das doenças micóticas que mais acometem o homem, figurando entre as de maior ocorrência em todo o mundo (KALINOWSKA, 2012). Estima-se que 30% a 70% da população mundial presente ou apresentou *tinea pedis*, muitas vezes com evolução clínica oculta ou subclínica (LACAZ et al., 2002; PORCHE, 2006). As lesões aparecem nas bordas e plantas dos pés (Fig. 5 g) sob três formas mais comuns: (a) forma desidrosiforme ou vesiculosa – é o tipo pruriginoso, inflamatório, com vesículas drenando um líquido esbranquiçado; (b) forma intertriginosa crônica – a mais frequente, com fissuras e maceração entre o 3º e 4º espaços inter-pododáctilos e (c) forma escamosa crônica – lesões bilaterais, descamativas, bem semelhantes à dermatite esfoliativa (LACAZ et al., 2002; DIEGO, 2011; KALINOWSKA, 2012). O curso das lesões é crônico e recorrente e por vezes agravado por infecções secundárias e alergias. TPe é ocasionada particularmente por dermatófitos

antropofílicos – *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* e *E. floccosum* (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; DIEGO, 2011).

Na Espanha, em 2009 procedeu-se um estudo epidemiológico em crianças da cidade de Barcelona, verificando-se TPe como a micose mais frequente, com *T. mentagrophytes* sendo a principal espécie relacionada aos casos (PÉREZ-GONZALÉZ et al., 2009). Em 2002, em Hong Kong, foram investigados 1014 pacientes em relação à TPe e onicomicoses, constatando-se pé de atleta em 20,4% dos indivíduos analisados, o que representa uma taxa relativamente elevada, quando compara-se com a TUn com um percentual de 16% (CHENG; CHONG, 2002). Em 2011 na Bélgica, relatou-se um caso de TPe interdigital bem grave, em uma paciente diabética (VANHOOTEGHEM et al., 2011). No Brasil, já foram reportados alguns casos de TPe, com lesões mais localizadas na região plantar do que interdigital e tendo *T. rubrum* como principal agente etiológico (FURTADO et al., 1990). No RS, durante o período de 1988-1997 um total de 1.986 casos de dermatofitose foi diagnosticado no Laboratório de Pesquisas Micológicas do Hospital Universitário de Santa Maria, dos quais 909 (45,8%) foram relatados como *tinea pedis*, com *T. mentagrophytes* como o dermatófito mais prevalente (LOPES et al., 1999b).

Além de todas as manifestações clínicas das formas de dermatofitose isoladamente em cada paciente, cabe ressaltar que coinfeções dermatofíticas são possíveis e já foram relatadas (INDIRA et al., 2014). Infecções mistas, envolvendo mais de um tipo de tinha em um mesmo paciente ou um tipo de tinha ocasionada por vários agentes etiológicos dermatófitos (LACERDA, 2008) ou ainda a manifestação simultânea das tinhas e outra patologia (de origem micótica ou não) (FREITAS et al., 2013), cada vez mais são comumente observadas, embora ainda não tenham uma elevada prevalência na clínica. Na Índia, de 400 casos de dermatofitose, 14 (3,5%) eram infecções dermatofíticas mistas em um mesmo indivíduo. Nesse mesmo estudo, verificou-se que o mais ocorrente é a combinação de *tinea corporis* com *tinea cruris* e *tinea unguium* com *tinea manuum* (INDIRA et al., 2014). Já foi relatado também um mix de parasitismo em infecções micóticas, relacionado à coinfeções por dermatófitos e *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* e *Mucor* spp. (ADEFEMI; ODEIGAH; ALABI, 2011).

3.1.3. Diagnóstico, prevenção e controle

O diagnóstico das dermatofitoses é realizado por meio da anamnese - observação das manifestações clínicas das lesões e pela investigação micológica, na qual se verifica a presença do fungo no material clínico (KONEMAN et al., 2006; MORIELLO; NEWBURY, 2006; REFAI; EL-YAZID; EL-HARIRI, 2013). Biópsia (exame histopatológico) tende a ser usada principalmente quando a apresentação das lesões é incomum (KONEMAN et al., 2006). Aliado a isso, a biologia molecular também pode ser útil, por exemplo, a técnica de PCR já foi publicada em vários trabalhos com dermatófitos, tornando-se cada vez mais um método de diagnóstico de precisão e extremamente vantajoso, em casos específicos de diferenciação de espécies de um complexo, por exemplo, como ocorre para *T. mentagrophytes* (KONEMAN et al., 2006; MORIELLO; NEWBURY, 2006; REFAI; EL-YAZID; EL-HARIRI, 2013; CHALUPOVÁ et al., 2014).

O diagnóstico micológico é muito importante, pois permite confirmar a etiologia das dermatofitoses, estabelecer a terapia correta, correlacionar os resultados obtidos com a situação socioeconômica da população afetada e aplicar medidas profiláticas baseadas na espécie identificada. O diagnóstico definitivo baseia-se em uma série de etapas, observações e exames que vão desde o histórico clínico, exame físico, exame com luz ultravioleta, coleta, microscopia direta do material, cultura fúngica e identificação final do agente patógeno (MORIELLO; NEWBURY, 2006).

A lâmpada de Wood é um método diagnóstico para infecção dermatofítica, ela emite ondas de luz ultravioleta de comprimento de 330 a 365 nanômetros, e é utilizada no exame de pelos ou tecidos suspeitos de dermatofitose, que podem florescer em presença direta dessa luz em local escuro; há fluorescência para as espécies *M. canis* e *T. quinckeanum* (KONEMAN et al., 2006; MORIELLO; NEWBURY, 2006). Nem todas as cepas dos fungos dermatófitos apresentam fluorescência e certas preparações tópicas, bem como o álcool podem mascará-la ou fazer com que a mesma não seja específica. Essa técnica é indicada também para selecionar pelos para exame tricográfico, cultura fúngica e controle de tratamento (KONEMAN et al., 2006; MORIELLO; NEWBURY, 2006; REFAI; EL-YAZID; EL-HARIRI, 2013).

O exame microscópico dos raspados da pele ou do material clínico, incluindo pelos e unha pode revelar hifas e/ou artroconídios. As amostras devem ser selecionadas a partir das margens das lesões ativas, com antissepsia prévia da área acometida com álcool 70° GL (KONEMAN et al., 2006). Os pelos selecionados devem ser aqueles que apresentam fluorescência sob a lâmpada de Wood, ou que estão quebrados ou possuem alguma parte escamosa. As escamas das unhas são as mais difíceis de examinar, pois os fungos raramente estão abundantes nesses locais. Simplificadamente, no exame direto disponibiliza-se o material clínico a ser examinado na lâmina, acrescentando-se uma gota de KOH 10% a mesma. Recobre-se com lamínula e ligeiramente aquece-se na chama, pois a solução de potassa irá clarificar o fungo, na medida em que faz a digestão a quente de materiais proteínáceos, desagregando o material esclerótico, sem danificar o fungo. As hifas das espécies dermatofíticas não serão alteradas por esse tratamento, permanecendo refrateis, hialinas, septadas e ramificadas, viáveis para uma clara identificação (KONEMAN et al., 2006; MORIELLO; NEWBURY, 2006; REFAI; EL-YAZID; EL-HARIRI, 2013).

Os dermatófitos podem ser cultivados em vários meios de crescimento, incluindo o Agar Sabouraud Dextrose (por exemplo, com ciclohexemide), sendo esse o meio padrão para o isolamento primário. Existe também um meio de teste específico para dermatófitos (Fungassay teste de dermatófitos), que se baseia na alteração de cor do meio de cultura que, na presença de colônias dermatofíticas, passa de âmbar a vermelho, sendo os resultados visíveis a partir das 48 horas (KONEMAN et al., 2006). As culturas, de um modo em geral, são incubadas à temperatura ambiente (25–30 °C), sendo que, geralmente, as colônias tornam-se visíveis dentro de 1-2 semanas. Após o crescimento do micélio, pode-se transferir para o microcultivo (ou não), conforme a acuidade do especialista. A diferenciação micromorfológica dos dermatófitos é bem perceptível, fornecendo resultados fidedignos quanto à espécie patogênica em cada caso (KONEMAN et al., 2006; MORIELLO; NEWBURY, 2006; REFAI; EL-YAZID; EL-HARIRI, 2013).

Em relação à prevenção e controle das dermatofitoses incluem-se medidas simples de higiene pessoal e sanitária, tais como manter sempre hábitos higiênicos corpóreos adequados, secar bem as dobras e espaços interdigitais pós-banho e evitar sapatos muito apertados que retenham suor. Devem ser de uso pessoal e intransferível pentes, escovas e toalhas, sendo que o cuidado tem de ser maior

ainda por atletas (BASSIRI-JAHROMI; SADEGHI; PASKIAEE, 2010). Deve-se evitar contato muito próximo com indivíduos e animais infectados e, sobretudo deve-se realizar uma limpeza periódica de pisos e paredes, principalmente de locais públicos. Ocasionalmente, para evitar que animais doentes transmitam dermatófitos para os outros, eles devem ser isolados até que a infecção tenha sido eliminada (BASSIRI-JAHROMI; SADEGHI; PASKIAEE, 2010; REFAI; EL-YAZID; EL-HARIRI, 2013).

Encontram-se vacinas disponíveis em alguns países, para animais, e específicas contra determinados dermatófitos, tais como *T. verrucosum* e *T. mentagrophytes* - para o gado, raposas, chinchilas e coelhos; *T. equinum* - para cavalos e *M. canis* - para cães e gatos (GUDDING; LUND, 1995; REFAI; EL-YAZID; EL-HARIRI, 2013). Em alguns países, as vacinas têm sido utilizadas em campanhas de erradicação dermatofítica. Na Noruega, há um programa de erradicação de *T. verrucosum* de rebanhos bovinos por meio de vacinação, desinfecção de estábulos contaminados e isolamento dos animais infectados. Com isso, em uma região da Noruega e da antiga União Soviética a prevalência da micose no gado diminuiu de 70% para 1%, durante um período de 8 anos (GUDDING; LUND, 1995; REFAI; EL-YAZID; EL-HARIRI, 2013).

No que concerne à desinfecção, os conídios dermatofíticos são relativamente suscetíveis ao cloreto de benzalcônio, hipoclorito de sódio a 1%, formaldeído, entre outros (MADRID et al., 2012). Em um estudo com solução de cloreto de benzalcônio a 10%, relatou-se que o mesmo impediu o crescimento de *M. canis* em 97% das escovas de cabelo contaminadas, que foram analisadas (MARCHETTI et al., 2006). Outro estudo demonstrou que uma preparação contendo brometo de benzidamina e álcool láurico foi eficaz contra dermatófitos antropofílicos, comumente encontrados em pisos (principalmente de quartos) (REFAI; EL-YAZID; EL-HARIRI, 2013). Relata-se que *in vitro* os dermatófitos também são suscetíveis a iodoforos, glutaraldeído e compostos fenólicos; no entanto, alguns agentes podem ter uma eficácia limitada, quando utilizados na prática. A remoção mecânica de qualquer material contaminado que contenha queratina, como cabelos e pedaços de unhas, facilita a desinfecção. Após a remoção mecânica, superfícies laváveis devem ser limpas cuidadosamente com água e detergente (CORRÊA; CORRÊA, 1992; ROCHETTE; ENGELEN; BOSSCHE, 2003). Os dermatófitos são suscetíveis ao fogo alto. O calor úmido de 121 °C, aplicado durante pelo menos 20 minutos, ou o calor seco de 165-

170 °C, durante 2 horas, são referidos como sendo eficazes (PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA, 2010).

3.2. Terapêutica das dermatofitoses

3.2.1. Tratamento convencional

A escolha do tratamento mais apropriado para as dermatofitoses é determinada pela extensão da infecção, pelo sítio anatômico afetado e pela espécie dermatofítica envolvida em cada caso, tão bem quanto pela eficácia, perfil de segurança e biodisponibilidade dos antifúngicos disponíveis (TORRES, 2005; PIRES et al., 2014). A terapêutica pode ser conduzida topicamente, sistematicamente ou associando-se ambas as formas, combinadas ou não a antibacterianos, substâncias queratolíticas, bem como a remoção de restos de escamas e pelos infectados (FULLER et al., 2014; PIRES et al., 2014).

Os antifúngicos tópicos aplicados localmente nas lesões podem ser apresentados sob a forma de gel, cremes, esmalte ou pomadas (TORRES, 2005). Esse tipo de tratamento pode ser utilizado como apoio à terapêutica oral e como profilaxia, a fim de evitarem-se recidivas. Os antifúngicos da linha tópica atrasam o crescimento dos dermatófitos e, geralmente, são bem tolerados e requerem somente uma aplicação diária (DEL PALACIO et al., 2000; FULLER et al., 2014). A terapia tópica faz-se muito útil no caso de lesões limitadas, superficiais e situações como gravidez, lactação ou para se evitar interações com outros fármacos orais. Mais comumente são utilizadas formulações à base de tintura de iodo ou cremes e soluções de cetoconazol, isoconazol, miconazol, clotrimazol, bifonazol, terbinafina e ciclopirox olamina, sendo essa última bem popular na prática clínica para o tratamento tópico, em especial de onicomicoses (SHEMER et al., 2010; FULLER et al., 2014).

Os produtos tópicos possuem características vantajosas e são largamente empregados na prática para infecções dermatofíticas, porém nos casos avançados, por exemplo, de *tinea unguium* e *tinea capitis*, bem como em dermatofitoses disseminadas e severas, a via mais recomendada é a oral (RUBIO et al., 1999). A terapia sistêmica das dermatofitoses é ainda principalmente indicada quando as lesões são generalizadas, recorrentes, de caráter crônico, ou quando não há resposta à terapia tópica. Cabe ressaltar-se que os regimes orais convencionais

estão associados com tratamentos por longos períodos, o que ocorre também com a terapia tópica – entre 8 a 50 semanas – e, infelizmente, por consequência, ocorre baixa adesão e manutenção da terapêutica completa, pelo paciente (SHIVAKUMAR et al., 2011). O tratamento sistêmico oral é realizado principalmente pelo uso da terbinafina, griseofulvina e derivados azólicos como o cetoconazol, os quais possuem importante atividade antidermatofítica (HAINER, 2003; PIRES et al., 2014).

3.2.1.1. Ciclopirox olamina

Ciclopirox olamina (CPO) (Fig. 7) é um antimicótico, empregado muito comumente via tópica, pertencente à classe das hidroxipiridonas, com atividade antifúngica e antibacteriana, através de múltiplos mecanismos de ação. Esse popular conhecido produto tópico, primordialmente utilizado para as micoses de unha, liga-se a cátions trivalentes (por exemplo, Fe^{3+}) e tem capacidade de inibir várias enzimas citocromais metalo-dependentes (BOHN; KRAEMER, 2000; SUBISSI et al., 2010; LECERF; ANDRÉ; RICHERT, 2014). Relata-se ainda que o CPO afeta a produção energética mitocondrial, reduz a ação de peroxidases e catalases, as quais degradam peróxidos prejudiciais e tóxicos; e ainda afeta a síntese proteica e de ácidos nucleicos da célula fúngica. Agindo por tantas vias, CPO exerce, na maioria dos casos efeito fungicida, dependendo sempre da concentração utilizada e do tempo correto de tratamento (SUBISSI et al., 2010). Recomenda-se uma aplicação diária do esmalte de ciclopirox 8% por 24 a 48 semanas, para as unhas das mãos e pés, respectivamente (BOHN; KRAEMER, 2000; SUBISSI et al., 2010; LECERF; ANDRÉ; RICHERT, 2014). Existem formulações do esmalte a base de hidroxipropil quitosana, que facilitam mais a permeabilidade através da lâmina ungueal. Considera-se o uso do CPO nas onicomicoses subungueais (distal e lateral) mínimas, quando não houver mais de 50% da área total da unha comprometida e/ou quando o paciente não é um bom candidato para a terapêutica antifúngica por via oral (BOHN; KRAEMER, 2000; SUBISSI et al., 2010; LECERF; ANDRÉ; RICHERT, 2014).

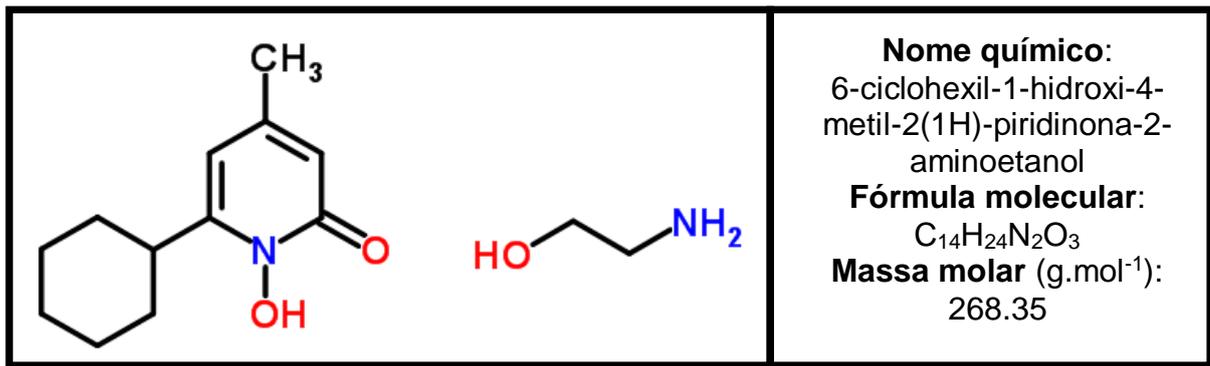


Figura 7. Estrutura e propriedades químicas do ciclopirox olamina (FONTE: CHEMSPIDER, 2014).

A partir de 1976, numerosos estudos foram conduzidos com o CPO em pacientes com infecções fúngicas da pele, sendo que uma série de trabalhos foi publicada desde então (SUBISSI et al., 2010). Em um levantamento de 20 estudos com 991 casos de doenças de pele, principalmente dermatofitoses (71%), realizado com creme de CPO a 1% e solução de CPO a 1%, observou-se que após um período de tratamento de três semanas, a taxa de sucesso terapêutico (cura clínica e micológica) foi de 96% (DITTMAR, 1981). Em 2005, avaliou-se a eficácia do gel de CPO 0,77% no tratamento da *tinea pedis interdigitalis*, com infecção bacteriana secundária, em um estudo prospectivo duplo-cego, randomizado e controlado por placebo. Nesse estudo, verificou-se, que o gel aplicado uma ou duas vezes ao dia reduziu significativamente os sinais e sintomas das lesões, na oitava semana de tratamento. As taxas de cura completa foram muito mais elevadas para o ciclopirox do que para o veículo e redução da contagem bacteriana foi também observada pós-tratamento com CPO (GUPTA; SKINNER; COOPER, 2005). Em 2014, em um estudo da eficácia do CPO 1% e cloridrato de terbinafina 1%, em um modelo de onicomicose dermatofítica *in vitro*, notou-se alta taxa de permeação para ambos os compostos analisados, que mostraram eficácia muito semelhante (TAUBER; MULLER-GOYMANN, 2014). Além da atividade contra fungos e bactérias, recentemente descobriram-se propriedades anticâncer para o CPO (SHEN; ZHOU; HUANG, 2013).

3.2.1.2. Terbinafina

A terbinafina (TBF) (Fig. 8) é um antimicótico empregado, por via tópica e/ou oral, no tratamento de infecções fúngicas cutâneas e até mesmo subcutâneas. TBF estabeleceu-se no mercado farmacêutico entre as décadas de 80-90 (PETRANYI; RYDER; STUTZ, 1984; N`DIAYE et al., 2006), sendo considerada um dos principais antifúngicos utilizados na prática, juntamente com o ciclopirox olamina, para a terapêutica das dermatofitoses (SOARES et al., 2013). Os dermatófitos, em geral, apresentam uma elevada suscetibilidade à TBF, especialmente empregada nos casos em que há condições crônicas da micose (SOARES et al., 2013). A TBF pertence à classe das alilaminas (alilamina terciária), fármacos sintéticos que atuam de forma distinta das demais classes de antifúngicos e cuja atividade, *in vitro* e *in vivo*, é direcionada especialmente contra dermatófitos e algumas leveduras, tendo também ação contra *Sporothrix schenckii*, *Scopulariopsis brevicaulis* e *Acremonium* spp. (GHANNOUM, 1997; LACAZ et al., 2002; SHEMER et al., 2014). A ação desse antifúngico dá-se pela inibição não competitiva, específica e seletiva da esqualeno epoxidase, uma enzima envolvida nas etapas iniciais da síntese do ergosterol, o principal esterol componente da membrana celular fúngica, acarretando tanto o acúmulo de esqualeno, como depleção de ergosterol (MOOSSAVI; BAGHERI; SCHER, 2001; ODSS; BROWN; GOW, 2003). Elevadas concentrações de esqualeno tóxico no citoplasma fúngico podem interferir na função da membrana e na síntese da parede celular dos fungos, bem como níveis deficitários de ergosterol influenciam na manutenção da célula, envolvendo tanto a membrana quanto a parede dos fungos, com consequência fungicida em espécies suscetíveis (MOOSSAVI; BAGHERI; SCHER, 2001). A TBF não tem uma elevada afinidade de ligação pela esqualeno epoxidase humana, e assim a produção de colesterol não é fortemente afetada (WAKELIN; MAIBACH, 2003).

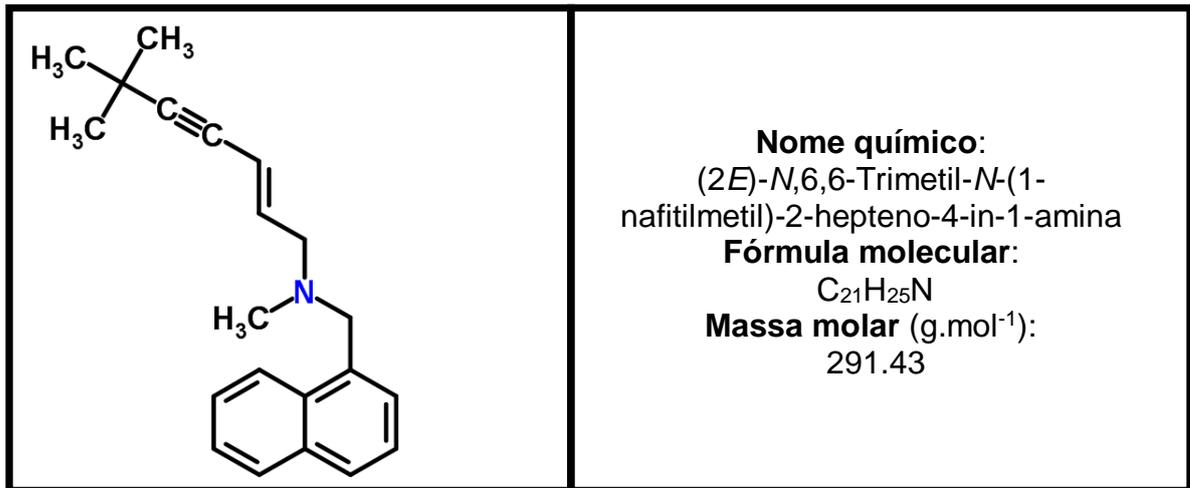


Figura 8. Estrutura e propriedades químicas da terbinafina (FONTE: CHEMSPIDER, 2014).

Em relação à farmacocinética, a TBF é um fármaco muito bem absorvido, após a sua administração oral e liga-se fortemente às proteínas plasmáticas (MOOSSAVI; BAGHERI; SCHER, 2001). Essa ligação não é específica e a eliminação plasmática é lenta. A afinidade da TBF pelo citocromo P450 é baixa, em contraste com os azóis, sendo essa uma das razões para uma menor taxa de interações da mesma com co-mediadores ou demais medicamentos, em comparação, por exemplo, com os triazólicos e imidazólicos (REFAI; EL-YAZID; EL-HARIRI, 2013). Além disso, trata-se de um antifúngico lipo e queratinofílico, que é extensivamente distribuído pelo tecido adiposo, derme, epiderme e unhas. Devido a isso e à eficácia comprovada, considera-se a TBF um dos antimicóticos mais apropriados para o tratamento das dermatofitoses e onicomicoses disseminadas pela pele, pelos e unhas, bem como para casos de candidíase cutânea (DARKES; SCOTT; GOA, 2003).

Relata-se para o uso específico da TBF no tratamento das dermatofitoses, que a mesma apresenta uma maior eficácia contra espécies do gênero *Trichophyton* (KAKOUROU; UKSAI, 2010). Logo após o início do uso da TBF, alguns estudos passaram a recomendá-la topicamente para lesões dermatofíticas não muito extensas, tendo um custo-benefício melhor que miconazol e cetoconazol tópicos (MCCLELLAN; WISEMAN; MARKHAM, 1999). Em um estudo de meta-análise de ensaios clínicos randomizados, observou-se que particularmente para a espécie *T. tonsurans*, a TBF e a griseofulvina tiveram uma eficácia semelhante, porém o tempo necessário de tratamento com TBF foi bem menor (4 semanas), do que com a griseofulvina (8 semanas), o que considera-se uma importante vantagem da TBF

nesse caso (GUPTA; DRUMMOND-MAIN, 2013). A dose habitual da TBF por via oral é 250 mg/dia. Para *tinea corporis* e *tinea cruris* administra-se a mesma durante 2 a 4 semanas, em *tinea pedis*, durante 2 a 6 semanas e em onicomicoses dermatofíticas, durante 4 a 12 semanas (REFAI; EL-YAZID; EL-HARIRI, 2013). A TBF demonstrou superioridade, em eficácia e segurança, em relação ao esmalte de ciclopirox olamina 8%, para o tratamento de onicomicoses em pacientes diabéticos (MATRICCIANI; TALBOT; JONES, 2011). Mais recentemente, estuda-se a administração intralesional de injetáveis contendo microesferas de TBF, de liberação controlada, para o tratamento de onicomicoses, como uma forma de aplicação mais localizada e direcionada do antifúngico, objetivando-se consequente melhora da eficácia e otimização do tempo de tratamento (ANGAMUTHU, 2014).

3.2.1.3. Griseofulvina

A griseofulvina (GSF) foi descoberta em 1939 (Fig. 9) por Oxford e colaboradores, tendo origem a partir do fungo *Penicillium griseofulvum* – foi o primeiro agente terapêutico específico para espécies fúngicas (ODSS; BROWN; GOW, 2003). É um derivado benzofurano, somente de administração via oral, com estrutura química (Fig. 10) semelhante à colchicina e com eficácia comprovada, principalmente para o tratamento de micoses cutâneas e onicomicoses dermatofíticas (LACAZ et al., 2002). O mecanismo de ação da GSF consiste na inibição da completa formação do fuso mitótico, por meio da interação com microtúbulos polimerizados, inibindo, desse modo, a mitose e o consequente desenvolvimento e crescimento fúngico, tendo ação fungistática (MOOSSAVI; BAGHERI; SCHER, 2001). Os microtúbulos são polímeros dinâmicos de dímeros de α e β tubulina, os quais formam um esqueleto celular altamente organizado em todas as células eucarióticas. O que se sabe até então, é que a griseofulvina interage mais especificamente com a β tubulina, desagregando então os microtúbulos e interferindo assim no processo mitótico (KATHIRAVAN et al., 2012).

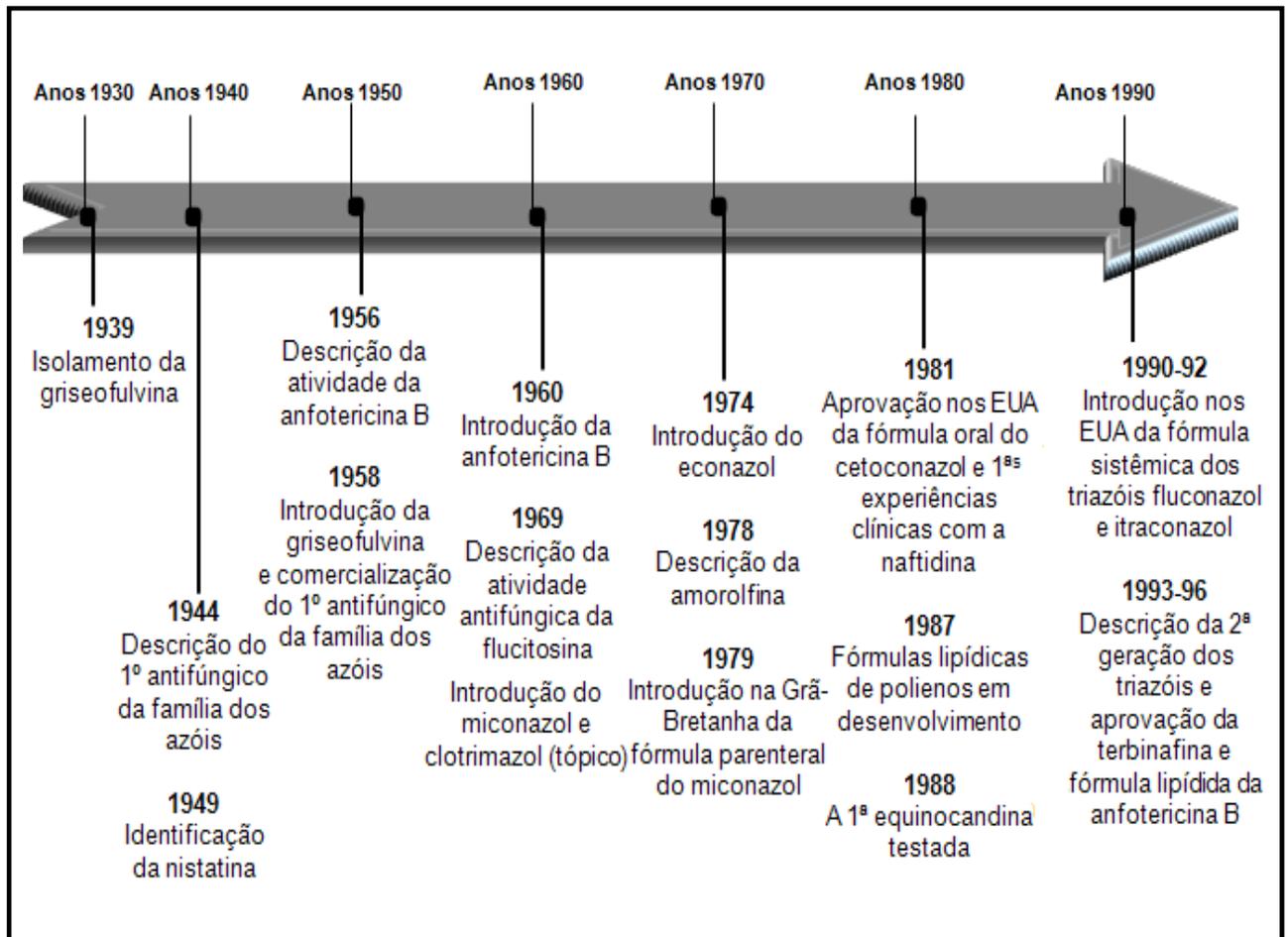


Figura 9. Principais marcos no desenvolvimento dos antifúngicos ao longo do século XX (FONTE: adaptado de LEMSADDEK, 2008).

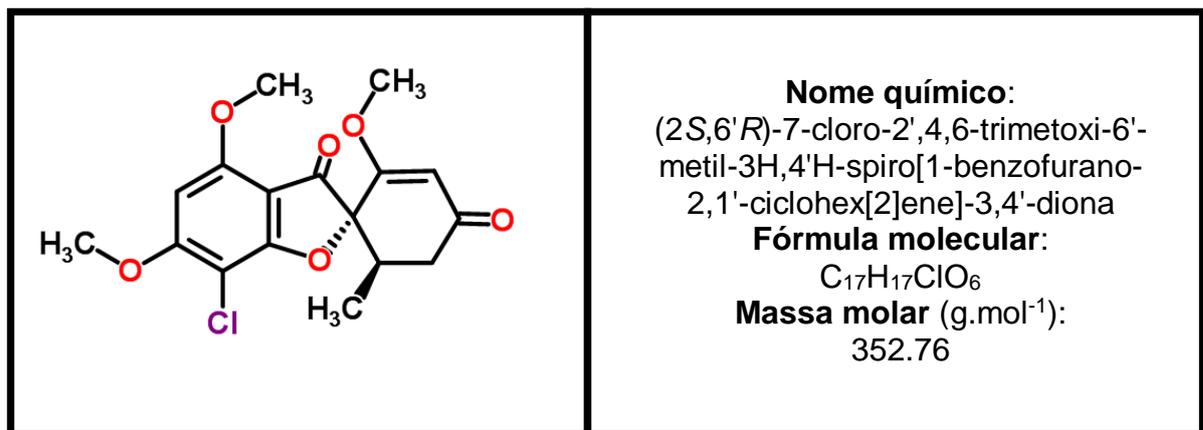


Figura 10. Estrutura e propriedades químicas da griseofulvina (FONTE: CHEMSPIDER, 2014).

Comercialmente a GSF está disponível em várias formas farmacêuticas (comprimidos, suspensão), porém a suspensão não é uma formulação licenciada, por exemplo, no Reino Unido, e os comprimidos já não estão disponíveis em alguns

países europeus, tendo sido substituídos por outros agentes antifúngicos (KAKOUREOU; UKSAI, 2010). As dosagens recomendadas variam muito com o tipo de formulação e o quão facilmente a mesma é absorvida (FULLER et al., 2014).

A GSF se distribui largamente por variados tecidos queratinizados (pele, pelos e unhas), sendo por isso, antes do surgimento dos antifúngicos terbinafina e imidazólicos, um dos primeiros antifúngicos de escolha para a terapêutica das tinhas. Sua indicação é direcionada especialmente aos casos de *tinea corporis*, *tinea capitis* e *tinea unguium*. GSF apresenta uma maior aplicabilidade para o tratamento das dermatofitoses ocasionadas por espécies do gênero *Microsporum*, especialmente *M. canis* (CHADEGANIPOUR; NILIPOUR; HAVAEI, 2004). A partir de sete estudos de meta-análise, observaram-se taxas de resposta terapêutica com o uso da GSF diferenciadas, em relação às espécies dermatofíticas, evidenciando-se para espécies do gênero *Microsporum*, uma taxa de aproximadamente 90% e para *Trichophyton* cerca de 70%, corroborando com a afirmação de efetividade espécie-específica desse antifúngico (GUPTA; COOPER; BOWEN, 2008). Em concordância a isso, outro estudo de meta-análise recente sugere que um tratamento de 8 semanas com GSF é bem mais efetivo que um tratamento de 4 semanas com terbinafina em tinhas do couro cabeludo, envolvendo espécies microspóricas, o que não se verifica para as espécies tricofíticas (GUPTA; DRUMMOND-MAIN, 2013). Por ser um antifúngico de baixa solubilidade, envolvendo problemas de precipitação, há atuais pesquisas no desenvolvimento e modulação da liberação *in vitro* e melhora da solubilidade da GSF, utilizando, por exemplo, nanopartículas de sílica na formulação desse composto (JAMBHRUNKAR et al., 2014), bem como menciona-se para o mesmo polimorfismo (MAHIEU et al., 2013).

3.2.1.4. Cetoconazol

O cetoconazol (CTZ) (Fig. 11), pertencente à classe dos azólicos, que foram descobertos na década de 40 (Fig. 9), são totalmente sintéticos e apresentam-se como uma das maiores classes de antimicóticos em uso clínico, devido a sua já comprovada eficácia para micoses superficiais e profundas (ODSS; BROWN; GOW, 2003). Os compostos dessa classe são classificados como imidazólicos ou triazólicos, diferindo-se nas suas constituições químicas, com base no número de nitrogênios (N) presentes no anel azólico - composto de 5 membros, sendo que os

imidazólicos possuem 2 “N” e os triazólicos 3 “N” no heterociclo, respectivamente (LACAZ et al., 2002; ODSS; BROWN; GOW, 2003).

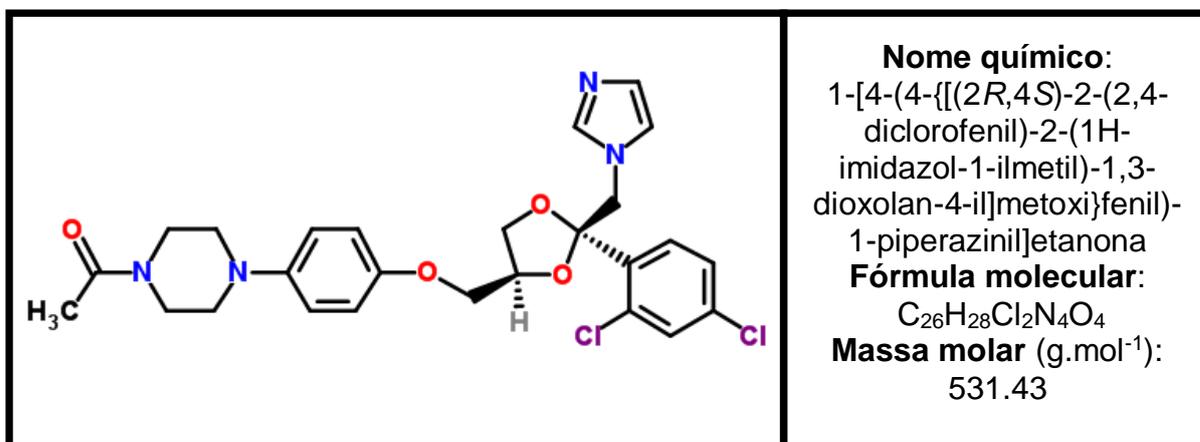


Figura 11. Estrutura e propriedades químicas do cetoconazol (FONTE: CHEMSPIDER, 2014).

Em relação à estrutura-atividade das diferentes classes de azólicos, os compostos imidazólicos são particularmente substâncias dotadas de pronunciada versatilidade: possuem amplo espectro de atividade antimicrobiana, incluindo fungos, protozoários, bactérias e helmintos; são também relacionados a substâncias antitireoidianas (carbimazol e metiamazol) e a antianaeróbios (metronidazol). Além disso, os derivados imidazólicos possuem evidente ação imunomoduladora (LACAZ et al., 2002). O que confere essa forte atividade antimicótica aos imidazólicos são as ligações moleculares nas posições 1, 2 e 3 do anel imidazólico. Os parâmetros essenciais para a ação antifúngica são a presença de, pelo menos, um anel imidazólico e a união desse anel ao restante da molécula por ligações “C-N” (LACAZ et al., 2002). Apesar das diversidades químico-estruturais entre as classes de azóis, que de algum modo interfere no espectro de ação e toxicidade, acredita-se que o mecanismo de ação compartilhado seja o mesmo (HAMDAN; HAHN, 2006).

CTZ foi o primeiro imidazólico oral biodisponível, com amplo espectro de ação, e a primeira alternativa sistêmica à griseofulvina no tratamento das dermatofitoses, também se apresentando na opção tópica (MOOSSAVI; BAGHERI; SCHER, 2001). O mecanismo de ação desse antifúngico lipofílico, basicamente, consiste em impedir a biossíntese normal do ergosterol – lipídio base para a estrutura da membrana celular fúngica – pela inibição da enzima lanosterol 14- α -demetilase, a qual faz parte de um sistema enzimático microsossomal dependente do

citocromo P450 (HAMDAN; HAHN, 2006). Logo, há um prejuízo da biossíntese do ergosterol na membrana, que conduz a um acúmulo de 14- α -metilesteróis. Esses metilesteróis desagregam o compacto arranjo lipídico da membrana, com alteração da fluidez da mesma e consequências secundárias em enzimas também envolvidas na síntese da parede e H⁺/ATPase, inibindo assim o crescimento fúngico e apresentando, portanto, efeito fungistático (MOOSSAVI; BAGHERI; SCHER, 2001; ODSS; BROWN; GOW, 2003).

CTZ é eficaz no tratamento da blastomicose, histoplasmose, coccidioidomicose, paracoccidioidomicose, *tinea versicolor*, candidíase mucocutânea crônica, oral e esofagiana, vulvovaginite por *Candida* e infecções dermatofíticas cutâneas, não sendo muito recomendado na terapêutica de aspergilose e mucormicose (PEI-LAN; LI-MIN H; PO-REN, 2007). Especificamente, em relação às dermatofitoses, estudos demonstram que o creme de cetoconazol a 2% tem sido eficaz e seguro no tratamento de *tinea pedis*, *tinea cruris* e *tinea corporis*, atuando em infecções ocasionadas pelas espécies dos três gêneros – *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton* (LESTER, 1995). As taxas de cura com CTZ referentes ao tratamento das tinhas da pele glabra muito se assemelham com as taxas de resposta a terapêutica com a GSF (REFAI; EL-YAZID; EL-HARIRI, 2013). Em 2003, em um estudo para avaliação *in vitro* do CTZ e outros agentes antifúngicos contra *Trichophyton* spp. e *Microsporum* spp., constatou-se valores de concentração inibitória mínima (CIM) baixos para a maioria dos isolados clínicos, ou seja, as espécies mostraram-se bastante sensíveis (GUPTA; KOHLI, 2003). Em 2013, relatou-se o uso tópico do xampu de cetoconazol em combinação com terbinafina oral, durante três meses, em uma criança com *tinea capitis* (apresentando lesão do tipo quérion de celsi), com melhora progressiva da paciente (ANAHORY; SANTOS; BORGES, 2013).

3.2.1.5. Tratamento combinado

A associação de antimicóticos tem produzido cada vez mais avanços no tratamento das dermatofitoses, principalmente quando se trata de casos mais graves e disseminados. Já foram descritas na literatura combinações entre terbinafina e itraconazol oral administrados de forma consecutiva; tioconazol tópico e griseofulvina oral; terbinafina e ciclopirox olamina; griseofulvina e amorolfina, entre

outras (MAGAGNIN, 2010). Algumas dessas combinações ainda não possuem ação total sobre dermatófitos resistentes, porém, todas apresentam evidências de efetiva melhora dos quadros clínicos infecciosos, quando comparadas com a monoterapia oral ou tópica tradicional (GROVER et al., 2007; HAVLICKOVA; FRIEDRICH, 2008).

Estudos mais recentes apontam que em relação ao tratamento de escolha para a maioria das dermatofitoses, há uma predominância da terapia combinada com antifúngicos tópicos e sistêmicos (62,8%), sendo os azólicos (33,1%) e ciclopirox olamina (49%) a combinação de agentes sistêmicos e tópicos mais comumente prescrita (PIRES et al., 2014). A terbinafina vem sendo cada vez mais utilizada em combinação com outros agentes antifúngicos no tratamento das micoses refratárias, como onicomicoses dermatofíticas, devido à sua capacidade, observada *in vitro*, de sinergismo com demais compostos (DALLA LANA, 2014). Usando-se modelos de farmacocinética e farmacodinâmica nota-se uma potente sinergia entre a terbinafina e antifúngicos azólicos, o que aumenta consideravelmente a chance de sucesso terapêutico. Os mecanismos de ação complementares da TBF e azóis em diferentes pontos da via de biossíntese do ergosterol fúngico, teoricamente têm um impacto maior na inibição e até mesmo morte do micro-organismo (DOLTON et al., 2014). Para os casos de *tinea pedis* com hiperqueratose, observou-se que a utilização da combinação de pomada de ureia a 10%, juntamente com terbinafina tópica e oral, otimiza o tempo de tratamento, fazendo com que o paciente apresente maior adesão, além de ser segura e eficaz (SHI et al., 2014). No Brasil, são comumente comercializadas associações dos antifúngicos mais recomendados para as tinhas com anti-inflamatórios e antibióticos, por exemplo, CTZ e betametasona, CTZ, betametasona e neomicina, dentre outras formulações, a fim de amenizar os sinais inflamatórios locais e gerais decorrentes da infecção fúngica, além de auxiliar no processo de cicatrização das lesões (KOROLKOLVAS, 1998; PERARO, 2001; AGOSTINHO et al., 2013).

Para o tratamento em animais, o mais comum também é a associação entre agentes tópicos e sistêmicos, porém antifúngicos sistêmicos são raramente usados em animais de grande porte, devido ao custo desses medicamentos e a natureza geralmente autolimitada da doença (BOULTON et al., 2013; REFAI; EL-YAZID; EL-HARIRI, 2013). Os antifúngicos disponíveis para o tratamento das dermatofitoses em animais incluem produtos tópicos (cremes antifúngicos ou xampus), e sistêmicos (BOULTON et al., 2013; KIRMIZIGUL et al., 2013; REFAI; EL-YAZID; EL-HARIRI,

2013). Os mesmos princípios e opções de terapêutica em humanos aplicam-se aos animais, no entanto, considerações de ordem prática limitam o uso de alguns antifúngicos sistêmicos em algumas espécies, devido também à problemática de eventual toxicidade.

3.2.2. Novos compostos com potencial antidermatofítico

Produtos naturais vêm sendo investigados em relação à atividade antidermatofítica (EISENBERG et al., 1993; MACHADO et al., 2009; LAU et al., 2010; PINTO et al., 2011; PARK et al., 2011; SOARES et al., 2013; KALAIVANAN; CHANDRASEKARAN; VENKATESALU, 2013). Os derivados naturais são uma fonte de numerosos agentes de valor clínico terapêutico e também inspiram o desenvolvimento de compostos sintéticos e semissintéticos (WILSON; DANISHEFSKY, 2006). Nesse aspecto, derivados de plantas medicinais são importantes para investigação farmacológica e desenvolvimento de novos protótipos, os quais podem ser utilizados diretamente como agentes terapêuticos, bem como ser uma fonte de matéria prima para a síntese (WILSON; DANISHEFSKY, 2006; SOARES et al., 2013). No entanto, percebe-se uma necessidade de maior interdisciplinaridade de estudos toxicológicos e clínicos que confirmem a segurança e eficácia de uma provável utilização futura destes produtos como antifúngicos, visto que a maioria dos estudos com substâncias naturais relatam a atividade antidermatofítica desses compostos, geralmente em altas concentrações e, por vezes, do extrato bruto, sem o isolamento de componentes majoritários e caracterização dos prováveis metabólitos secundários responsáveis por tal ação contra os dermatófitos (MACIEL; PINTO; VEIGA, 2002).

Em relação aos produtos de síntese, sabe-se que os fármacos de origem sintética, já utilizados na clínica, representam significativa parcela do mercado farmacêutico (MENEGATTI; FRAGA; BARREIRO, 2001; BADE; CHAN; REYNISSON, 2010). Até 1991, entre 866 fármacos usados na terapêutica, 680 (79%) eram de origem exclusivamente sintética. O restante, 186 (21%), correspondia àqueles de origem natural ou semissintética. Quando se observa a estrutura das moléculas sintéticas empregadas na terapêutica, constata-se que 62% delas possuem heterocíclicos, ou seja, possuem átomos de elementos distintos do carbono (heteroátomos) envolvidos em ciclos, dentre os quais 95% apresentam-se

nitrogenados, 28% com átomos de enxofre e 18% com átomos de oxigênio (BARREIRO, 1991; MENEGATTI; FRAGA; BARREIRO, 2001).

Em 2001, a atividade antifúngica de 5 novos compostos sintéticos foi avaliada contra *T. rubrum* e *E. floccosum*, sendo que os dois pirazóis-tiocianatos testados mostraram-se altamente ativos contra ambas as espécies dermatofíticas, o que foi confirmado através da análise por microscopia eletrônica de varredura e de transmissão (ROMAGNOLI et al., 2002). Em 2014, um estudo avaliou as atividades antifúngicas de naftoquinonas sintéticas contra dermatófitos, constatando que todas apresentaram atividade contra *M. canis*, *M. gypseum*, *T. rubrum* e *T. tonsurans*, com faixas de CIM variando entre 5 - 28 µg/mL, relacionando-se o mecanismo de ação a lise na membrana celular dermatofítica (FERREIRA et al., 2014). Ademais desses, alguns poucos outros estudos relatam a ação antidermatofítica promissora de derivados sintéticos, porém com os mesmos apresentando relativa toxicidade *in vitro* (IWATA; YAMASHITA; UEHARA, 1989; ROSSI et al., 2011). Salienta-se que a síntese orgânica, apresenta características particulares, pois além de racionalizar uma sequencia de etapas visando obter os melhores rendimentos possíveis, é necessário também dispensar atenção ao grau de pureza e à escala da reação dos compostos, que podem ser planejados estruturalmente para um efeito antifúngico mais direcionado, eficaz e específico (MENEGATTI; FRAGA; BARREIRO, 2001).

Fazendo-se uma análise dos estudos na literatura, com a abordagem de investigação de novos compostos com atividade antidermatofítica, encontram-se bem menos trabalhos com substâncias sintéticas, comparadas com produtos naturais. Logo, o campo de pesquisa com moléculas cuja origem seja sintética, com ação contra os dermatófitos, tem muito ainda a ser explorado.

3.2.3. Problemas relacionados à terapêutica e resistência dermatofítica aos antifúngicos

Apesar do arsenal disponível de fármacos antifúngicos agir por diferentes mecanismos e vias, os alvos celulares são limitados em função da similaridade que existe entre as células eucarióticas fúngicas e humanas, em vários aspectos (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008). Os relatos de recorrentes falhas na terapêutica das dermatofitoses são normalmente associados com a descontinuação da terapia em decorrência do tratamento prolongado, efeitos adversos de alguns

antifúngicos e com a cada vez mais comum problemática de resistência dermatofítica (MUKHERJEE et al., 2003).

As lesões cutâneas localizadas na face, tronco e membros geralmente requerem no mínimo três semanas de tratamento; lesões nos pés quatro a seis semanas; e hiperqueratose nas palmas das mãos e solas são tratadas com antifúngicos orais, por três a seis meses. Inicialmente, quando a única opção era a griseofulvina, o tratamento era demasiadamente longo, especialmente nos casos de *tinea unguium*, que podia durar até seis meses para as unhas das mãos e até um ano para as unhas dos pés (DEL PALACIO et al., 2000). Estudos publicados envolvendo a terapêutica das onicomicoses dermatofíticas, em que os pacientes foram tratados com terbinafina oral (250 mg/dia) por 12 semanas, apenas 62% apresentou cura completa (melhora dos sintomas e negatização fúngica nos exames realizados) (MOOSSAVI; BAGHERI; SCHER, 2001). Adicionalmente, existe uma dificuldade generalizada em tratar casos de *tinea unguium*, revelando-se como um grande desafio, tanto para o micologista como para o clínico. A erradicação dermatofítica é complexa nessa condição, em virtude da queratina, muito densa, que participa da estrutura da unha (SIDRIM; ROCHA, 2004). Recidivas desse tipo de micose são reportadas, em média, em 35% dos casos (HAY, 2001).

Além disso, observam-se na prática clínica alguns efeitos adversos para os pacientes, em virtude da própria terapia prolongada, possíveis interações medicamentosas e uso incorreto dos antifúngicos (MOOSSAVI; BAGHERI; SCHER, 2001). Para CPO, os efeitos secundários mais comumente relatados incluem sensação de queimação na pele, irritação, vermelhidão, dor ou prurido, pós-uso tópico da substância (BOHN; KRAEMER, 2000; GUPTA; SKINNER; COOPER, 2005); com o uso da GSF pode, eventualmente, ocorrer anorexia, êmese, diarreia, anemia, neurotoxicose, alterações hematológicas, dentre outros distúrbios fisiológicos, sendo que o sintoma mais frequente é a dor de cabeça (MOOSSAVI; BAGHERI; SCHER, 2001). GSF é um antifúngico indutor enzimático, que acelera o metabolismo de outros medicamentos reduzindo a atividade desses, por exemplo, dos anticoagulantes orais e do fenobarbital. Logo, uma das eventuais limitações de seu emprego é a possibilidade de interações com demais medicamentos (BOUDGHENE-STAMBOULI; MERAD-BOUDIA, 1989; MIYAGAWA et al., 1989).

Como efeitos colaterais, decorrentes do uso da TBF pode-se evidenciar disfunção hepato-biliar, sintomas gastrointestinais, reações cutâneas e, mais

raramente, neutropenia (DEL PALACIO; LOPEZ-GOMEZ; LASTRA, 1990; BOLDEWIJN et al., 1996); e o principal risco do CTZ é a hepatotoxicidade, que é rara, mas pode tornar-se fatal, por ocorrer sem qualquer evidência clínica e evoluir após a interrupção do tratamento (MOOSSAVI; BAGHERI; SCHER, 2001). Outros efeitos adversos observados para o derivado imidazólico consistem em distúrbios gastrointestinais e prurido. Já foi registrada inibição da síntese de esteroides e testosterona pelo córtex suprarrenal com altas dosagens de CTZ, sendo essa última responsável pelo desenvolvimento de ginecomastia em alguns pacientes do sexo masculino (SUGAR et al., 1987) e, ademais podem ocorrer interações com outros fármacos (MOOSSAVI; BAGHERI; SCHER, 2001). Tais ocorrências em pacientes com imunodeficiência ou insuficiência renal, hepática, entre outras, tendem a ser muito comprometedoras, em virtude da evolução crônica que pode ocorrer.

Em 2014, relatou-se um caso de lesão hepática induzida pela terbinafina, em um paciente do sexo masculino de 55 anos, que fazia uso da TBF (250 mg/dia), para onicomicose dermatofítica por um mês. Ele desenvolveu severo quadro de icterícia e não tinha nenhum histórico de qualquer doença sistêmica (CHOUDHARY et al., 2014). Vários outros casos de hepatotoxicidade severa ocasionada por esse antifúngico alilamínico foram recentemente descritos na literatura (YAN; WANG; CHEN, 2014), bem como se relatam casos de interação medicamentosa de TBF com demais fármacos, ocasionando toxicidade para os pacientes (SHEIKH et al., 2014); e casos de desenvolvimento de lúpus eritematoso cutâneo subagudo, observado em paciente do sexo feminino, após o início da terapia com TBF (WAGNER; SACHSE, 2014). Para o CTZ, mais recentemente há pesquisas relatando quadros tóxicos graves ocasionados pelo mesmo (KAYE, 2013), que podem ser até fatais (DUMAN; TURHAL; DUMAN, 2001; KAYE, 2013).

Ademais dos inconvenientes da terapia antidermatofítica convencional prolongada e dos efeitos adversos em alguns casos, comuns a qualquer medicamento e não só antifúngicos, observa-se cada vez mais o surgimento de cepas resistentes ou multirresistentes (espécies resistentes a dois ou mais antifúngicos de classes diferentes) ao tratamento (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008; PERES et al., 2010; VENA et al., 2012). O crescente aumento da incidência de infecções fúngicas, aliado à SIDA e ao aumento da utilização de imunossupressores, foi seguido por uma utilização conseqüentemente mais ampla e frequente de antifúngicos, com intenções profiláticas e terapêuticas. A utilização

demasiada ou em doses abusivas e inadequadas dos antimicóticos faz com que as espécies fúngicas desenvolvam resistência, por evoluções epigenéticas e em resposta ao estresse, fortemente dificultando o tratamento (CALO et al., 2014). Essa resistência pode ser intrínseca (todos os membros da espécie são resistentes) ou extrínseco-adquirida (quando as espécies tornam-se resistentes mediante uma prévia exposição ao agente antifúngico) (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008).

Os mais importantes mecanismos moleculares e bioquímicos que contribuem para o fenótipo de resistência aos fármacos, nos fungos incluem: limitação à captação do medicamento; alteração ou degradação metabólica do antimicrobiano pelo micro-organismo; modificações na interação fármaco-alvo ou nas enzimas envolvidas na síntese do alvo, superexpressão ou superprodução do alvo, mutações pontuais, amplificação e conversão gênica (recombinação); aumento do efluxo celular do agente antimicótico, por exemplo, por uma maior expressão das bombas de efluxo, como os transportadores do tipo ABC (ATP binding cassette) (PERES et al., 2010; VENA et al., 2012). Esses possíveis mecanismos de resistência encontram-se representados na Fig. 12.

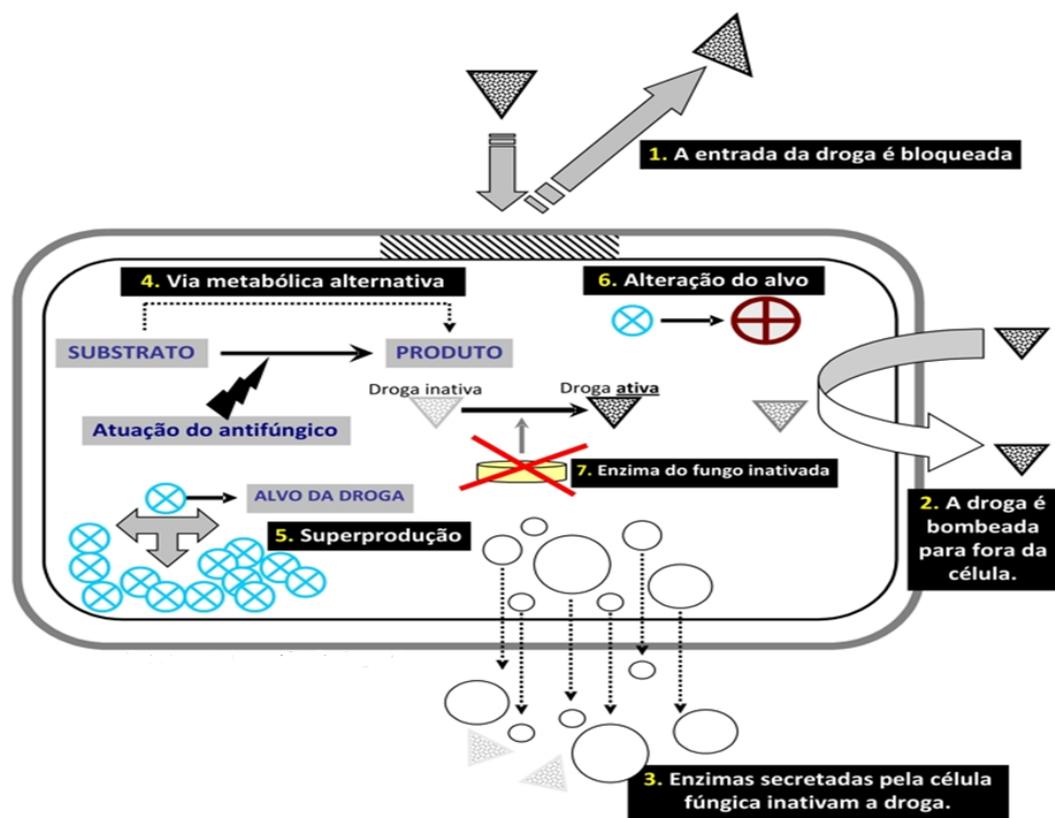


Figura 12. Mecanismos de resistência fúngica (FONTE: LOURENÇO, 2014).

As espécies fúngicas respondem a diversos estímulos do meio ambiente pela ativação de vias de transdução de sinais que controlam modificações ambientais. Essas vias asseguram o correto e rápido funcionamento de retornos fisiológicos, que possibilitam a adaptação fúngica a condições de risco, desenvolvendo respostas de tolerância celular ou simples defesa. Os antimicóticos induzem respostas fúngicas de estresse celular, ocasionadas pelos micro-organismos na tentativa de sobrepujar-se aos efeitos tóxicos dos agentes terapêuticos. O entendimento da adaptação dos fungos a situações adversas permite uma ideia mais ampla sobre a biologia dessas espécies, podendo revelar rotas metabólicas essenciais para sua manutenção e sobrevivência, e, por conseguinte, novos alvos celulares para prospecção de moléculas eficazes no controle e combate fúngico (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008).

A resistência específica de dermatófitos a agentes inibidores também envolve um ou mais dos mecanismos supracitados, como superexpressão de transportadores ABC, participação de modificadores de enzimas alvo e proteínas relacionadas ao estresse (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008). Para uma das espécies dermatofíticas mais comumente relatadas na clínica - *T. rubrum*, já se identificaram dois transportadores do tipo ABC, TruMDR1 e TruMDR2, os quais acredita-se não só estarem envolvidos no processo de multirresistência, mas também na secreção de enzimas e provavelmente na patogenicidade e virulência desse dermatófito (FACHIN et al., 2006; CERVELATTI et al., 2006; MARANHÃO et al., 2009). Os transportadores de efluxo de múltiplos fármacos são proteínas transmembrana (KANG et al., 2011), que conectam-se a uma variedade de agentes antifúngicos diferentes para expulsá-los para fora da célula fúngica, ainda contra um gradiente de concentração (KANG et al., 2011).

Em 2003, foi reportado o primeiro caso confirmado de resistência dermatofítica *in vivo* (clínica) e *in vitro* à terbinafina. Tratava-se de seis isolados clínicos de *T. rubrum*, originários de um mesmo paciente com onicomicose dermatofítica, cuja terapia oral com TBF (250 mg/dia por 24 semanas) não foi eficaz. Os isolados apresentaram *in vitro* um valor de CIM para TBF 4.000 vezes maior do que o valor encontrado para cepas-referência (sensíveis), com suscetibilidade também reduzida para outros inibidores da esqualeno-epoxidase, incluindo naftidina, butenafina, tolnaftato e tolciolato, sugerindo-se um mecanismo de resistência alvo-específico (MUKHERJEE et al., 2003). Em 2005, um estudo objetivou caracterizar as

possíveis modificações moleculares para a resistência dos isolados clínicos de *T. rubrum*, relatados por MUKHERJEE e colaboradores (2003). Posterior ao sequenciamento dos isolados e análise relataram-se substituições únicas de aminoácidos na enzima esqualeno epoxidase, o que explicaria a resistência, já que modificações no alvo implicam dificuldades no reconhecimento e consequente ação antifúngica das alilaminas, no caso específico dessa enzima envolvida (OSBORNE et al., 2005). Adicionalmente, dermatófitos mutantes resistentes à GSF são relatados desde a década de 60 (LENHART, 1969). Em um estudo realizado no México, em 2007, com 36 dermatófitos, detectou-se 7 espécies (19,4%) – três *T. rubrum*, três *T. mentagrophytes* e um *T. tonsurans* resistentes a um ou mais antifúngicos (MANZANO-GAYOSSO et al., 2008). Pesquisas mais recentes constataram resistência múltipla em cepas de *T. rubrum* em relação à terbinafina, itraconazol e amorolfina (GHELARDI et al., 2014).

Agregando-se a toda essa problemática apresentada, infelizmente, o arsenal terapêutico dos antifúngicos apresenta espectro de atividade muito variável, podendo levar a falha no tratamento *in vivo*, possivelmente devido à multifatores já mencionados, como baixa adesão dos pacientes à terapia, eventual baixa penetração do fármaco, problemas na biodisponibilidade do medicamento, interações medicamentosas ou (multi) resistência (MANZANO-GAYOSSO et al., 2008). Desse modo, há uma real necessidade de novos compostos antimicóticos mais eficazes e menos tóxicos, o que torna a pesquisa, por exemplo, por novos compostos antidermatofíticos, muito pertinente e relevante (SOARES et al., 2013).

3.3. Sais imidazólicos (SIMs)

3.3.1. Conceito e propriedades químicas

Os SIMs são compostos iônicos que apresentam em sua constituição estrutural um anel imidazólico carregado positivamente associado a um ânion (FRANZOI et al., 2011; MARKIEWICZ, 2012; RIDUAN; ZHANG, 2013). Simplificadamente, a maioria dos SIMs deriva-se do núcleo catiônico 1,3-dialquilimidazólio (Fig. 13 a), passando por processos de alquilação-substituição em ambos os átomos de nitrogênio (presentes no heterociclo aromático), sendo combinados a diferentes ânions. Dessa forma, os SIMs apresentam um núcleo

orgânico catiônico de simetria variável (anel imidazólico ressonante carregado positivamente) e uma parte aniônica (orgânica ou inorgânica), com ânions de variada coordenância, como o cloreto [Cl], brometo [Br], entre outros (Fig. 13 b) (FRANZOI et al., 2011; MARKIEWICZ, 2012; RIDUAN; ZHANG, 2013). Essa presença de cargas na estrutura dos SIMs é o que particularmente os diferencia e os inova dos demais compostos imidazólicos biologicamente ativos, que são neutros, como o clássico antifúngico imidazólico cetoconazol (RODRIGUES, 2010). Ademais, os SIMs possuem propriedades anfífilas, com regiões hidrofóbicas evidenciadas na extensão da cadeia alquílica lateral e regiões hidrofílicas concentradas no anel carregado positivamente, juntamente com o contra íon (Fig. 13 b) (RIDUAN; ZHANG, 2013).

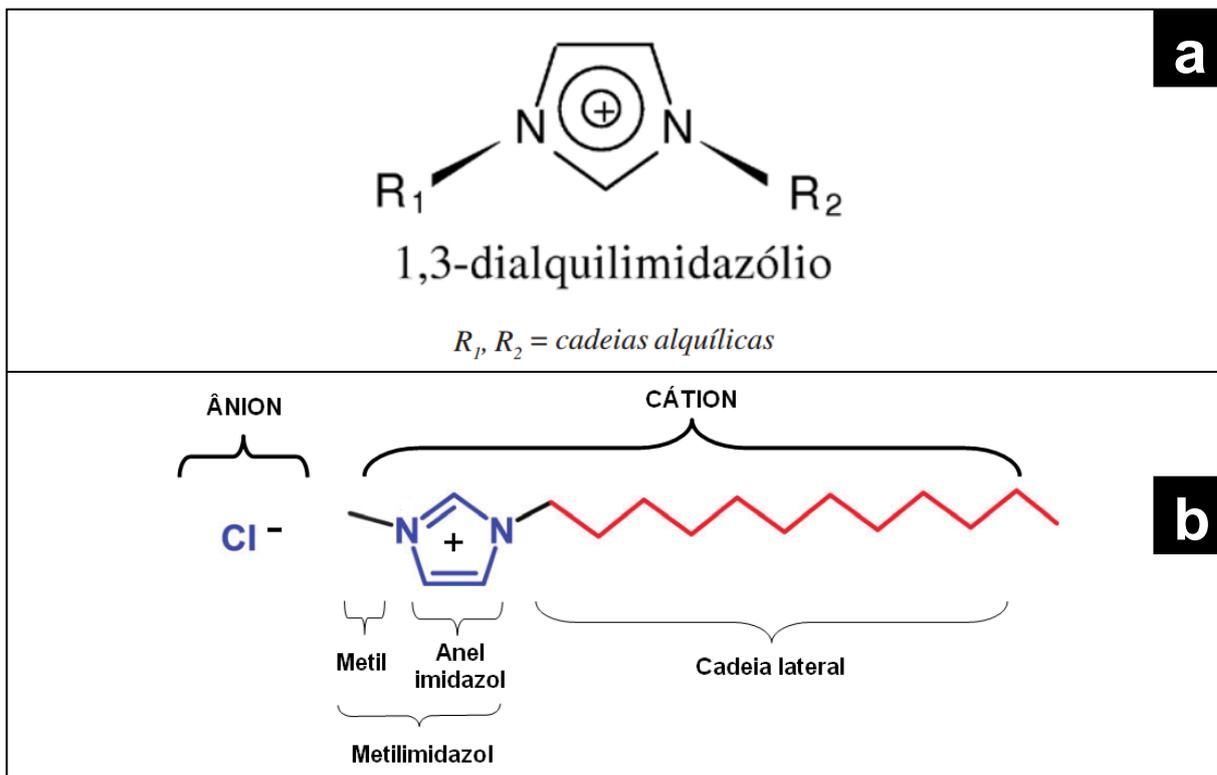


Figura 13. Representação esquemática – (a) estrutura do núcleo 1,3-dialquilimidazólio (FONTE: FRANZOI et al., 2011) e (b) estrutura química anfifílica de um sal imidazólico (cloreto de 1-*n*-dodecil-3-metilimidazólio) – regiões hidrofóbicas em vermelho e regiões hidrofílicas em azul (FONTE: adaptado de MARKIEWICZ, 2012; RIDUAN; ZHANG, 2013).

Dentro da grande classe dos SIMs, encontram-se os líquidos iônicos imidazólicos (LIs), que são sais imidazólicos no estado líquido em temperaturas de até 100 °C (Fig. 14) (RODRIGUES, 2010). Dentre esses LIs, há ainda uma

subclasse que são os líquidos iônicos imidazólicos a temperatura ambiente, sais fundidos em temperaturas de aproximadamente 25 °C (Fig. 14) (SCHREKKER et al., 2008; RODRIGUES, 2010). Geralmente, o ponto de fusão dos sais é menor que 100 °C, quando a cadeia alquílica saturada dos mesmos for composta por menos de 7 átomos de carbono (C), ou seja, um SIM com uma cadeia lateral de até 7 C constituintes, provavelmente será um líquido iônico. Excedendo-se 7 C, o ponto de fusão começa a aumentar, constituindo-se em um sal típico no estado sólido (RITTER, 2010). Porém, além do comprimento da cadeia alquílica, o tipo de ânion de cada sal é determinante no estado físico dos SIMs (SATO, 2011). Por exemplo, a presença de ânions mais volumosos na estrutura química, diminui o ponto de fusão e aumenta a viscosidade dos compostos (GALGANO, 2012). Logo, há uma junção de características individuais de cada molécula, que permite o estabelecimento dos mesmos na grande classe dos SIMs ou nas subclasses dos LIs ou LIs a temperatura ambiente (SATO, 2011).

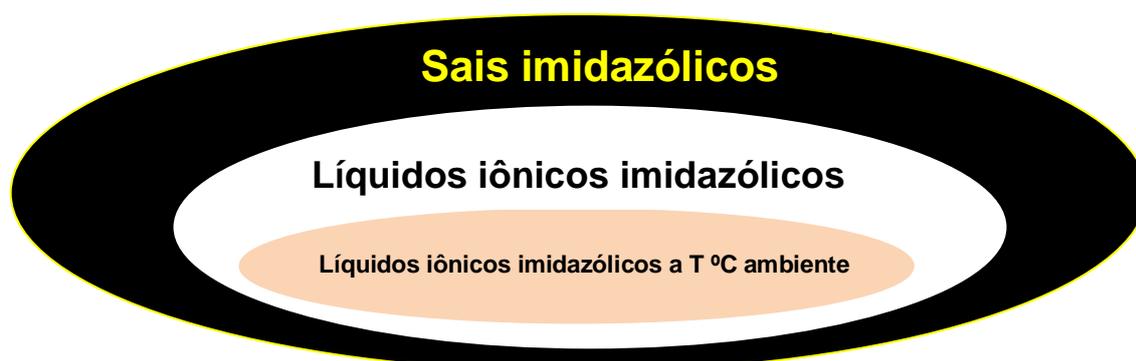


Figura 14. Representação esquemática das subclasses dos sais imidazólicos (FONTE: adaptado de RODRIGUES, 2010).

Em relação às propriedades químicas, os SIMs-LIs apresentam várias vantagens, tais como os LIs, por exemplo, além dos baixos pontos de fusão, o que facilita a forma de se trabalhar, apresentam baixa viscosidade e são meios menos agressivos quimicamente do que os sais inorgânicos fundidos, altamente corrosivos (RODRIGUES, 2010). Sabe-se ainda que os LIs são não-voláteis e possuem elevada estabilidade térmica, o que é extremamente benéfico, pois devido ao fato de não evaporarem, são utilizados em substituição aos solventes orgânicos convencionais, o que os qualifica como “solventes limpos/verdes”, ou seja, ambientalmente favoráveis e seguros (RODRIGUES, 2010). Além disso, são considerados compostos que possuem uma estrutura extremamente organizada e

com interações dos tipos van der Waals, eletrostáticas, e de hidrogênio (DUPONT; SOUZA; SUAREZ, 2002; RODRIGUES, 2010).

O aspecto mais promissor dos SIM-LIs é que características como ponto de fusão, solubilidade, resistência térmica, janela eletroquímica, entre outras, podem ser modificadas, variando-se aspectos estruturais como presença de grupos funcionais, comprimento da cadeia carbônica lateral, substituintes catiônicos e tipo de ânion (SCHREKKER et al., 2008). A partir disso, tem-se a ideia de compostos quimicamente planejados para um melhor desempenho e quiçá direcionados para uma atividade funcional específica. Adicionalmente, as propriedades exclusivas dessas substâncias lhes atribuem importância em diferentes áreas da química e da engenharia, tais como catálise orgânica e inorgânica, ciência dos materiais, eletroquímica, análises químicas e mais atualmente biológicas, em geral (DUPONT; SOUZA; SUAREZ, 2002; RODRIGUES, 2010).

3.3.2. Aplicações, potencial biológico e toxicidade

Os SIMs têm encontrado utilidade ampla principalmente como líquidos iônicos imidazólicos, sendo utilizados na aplicação em sistemas biológicos, bioengenharia e outras áreas, incluindo propósitos antitumorais, antioxidantes e antimicrobianos (RIDUAN; ZHANG, 2013; FARAL-TELLO et al., 2014). O grande emprego e versatilidade dessas substâncias decorrem, como já mencionado, da facilidade sintética de variações químicas, nas quais as características de solubilidade, anfifilicidade e lipofilicidade, entre outras, podem ser racionalizadas e sintonizadas, a fim da obtenção vantajosa desses compostos, para aplicações na área acadêmica, industrial, química e biológica (RODRIGUES, 2010; RIDUAN; ZHANG, 2013; FARAL-TELLO et al., 2014).

Os SIMs-LIs, mediante alongamento das cadeias alquílicas, adquirem propriedades tensoativas, as quais os tornam adequados para uma extensiva gama de aplicações industriais envolvendo: umectância, detergência, emulsificação, lubrificação, emoliência, solubilização e dispersão de fases. A alta deslocalização da carga positiva no anel imidazólio, que aliada ao caráter ácido do hidrogênio H2 do anel confere a esses compostos uma região interfacial diferenciada dos demais tensoativos (GALGANO, 2012). A compreensão dos processos envolvidos com esses surfactantes, bem como a miscelização de, por exemplo, LIs tensoativos, vem

sendo ainda motivo de muitas pesquisas, centradas na comparação direta com tensoativos clássicos (SATO, 2011).

Na química, os SIMs são bem conhecidos pelas suas funções na síntese orgânica, extrações e separações, principalmente utilizando-se líquidos iônicos a temperatura ambiente; também como precursores de carbenos estáveis e na catálise, como sistemas funcionais de síntese que permitem maior eficiência das reações (SCHREKKER et al., 2008; KHAZAEI et al., 2011). Como compostos iônicos, apresentam tipicamente alta condutividade e solubilidade e pelo arranjo estrutural bem ordenado, os SIMs-LIs são úteis na produção de nanomateriais, tais como nano compósitos poliméricos (DONATO, 2008), polímeros condutores, por exemplo, a polianilina ou nanopartículas metálicas. No caso da polianilina, fibras maiores podem ser sintetizadas e no caso das partículas metálicas, a força reticular do solvente, aplicando-se líquidos iônicos imidazólicos, impede a sua agregação, mantendo-as numa faixa controlada de tamanho (ITOH; NAKA; CHUJO, 2004; MIAO et al., 2006).

Em processos industriais, o fato de os LIs imidazólicos não evaporarem é muito valorizado, pois após o seu uso, os mesmos são integralmente reaproveitados, o que reduz de modo significativo os custos de produção (PLECHKOVA; SEDDON, 2008). Além disso, o que se observa na literatura são aplicações multidisciplinares dos SIMs, em diversas áreas da ciência, a partir da base inicial de seu benéfico uso no campo químico. Os estudos multivariados dessas substâncias, especialmente dos líquidos iônicos, é consideravelmente crescente, e são demonstrados em numerosas publicações e patentes (Fig. 15 e 16), no decorrer dos anos, o que claramente confirma-se no levantamento de dados de RODRIGUES (2010) (Fig. 15). Após o ano 2000, esses sistemas consolidaram-se, em grande parte devido à observação na prática laboratorial da estabilidade dos SIMs, sendo cada vez mais utilizados (Fig. 15) (RODRIGUES, 2010; FARAL-TELLO et al., 2014). Atualizando-se os dados apresentados por RODRIGUES (2010), constata-se um aumento progressivo do número de publicações envolvendo líquidos iônicos, com 4.527 publicações em 2008, 5.943 em 2010, 7.645 em 2012 e 7.728 em 2014, conforme levantamento no portal Web of Science (Fig. 16).

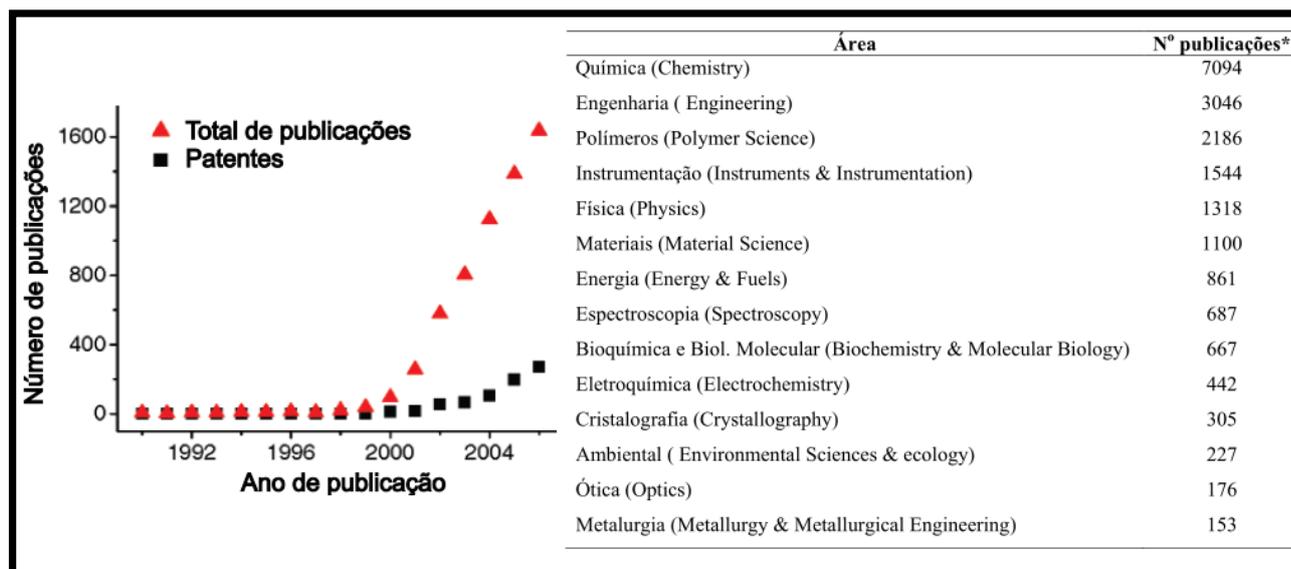


Figura 15. Histórico gráfico da produção científica e tecnológica envolvendo líquidos iônicos, dentre esses LIs imidazólicos, entre os anos 1990 até 2006 e número de artigos relacionados aos LIs publicados em diferentes áreas do conhecimento, de 2000 a 2009, conforme classificação do portal Web of Science (FONTE: RODRIGUES, 2010).



Figura 16. Histórico gráfico das publicações científicas envolvendo líquidos iônicos, dentre esses LIs imidazólicos, de 2008 a 2014, conforme classificação do portal Web of Science.

Em relação às investigações dos SIMs como moléculas bioativas, os mesmos vêm apresentando importante potencial biológico, medicinal e químico-farmacêutico (ZHAO et al., 2008; ANDERSON; LONG, 2010; HUANG et al., 2011; SCHREKKER et al., 2013; FARAL-TELLO et al., 2014). Em 2010, o SIM brometo de 1-mesitil-3-(2-naftoilmetano)-1H-imidazólio (MNIB) demonstrou propriedades antitumorais *in vitro*,

sendo ativo contra variadas linhagens tumorais (K562, SMMC-7721, EJ, AGZY, HEP-2, A549, HepG2) (ZENG et al., 2010). Em 2013, um estudo com SIMs bivalentes – com dois anéis imidazólicos na porção catiônica ligados por cadeias alifáticas de 20 a 22 carbonos – constatou potencial anti-inflamatório e anticâncer para esses compostos, em vista da capacidade dos mesmos de inibirem galactosiltransferases e outras glicosiltransferases em humanos, enzimas envolvidas nas metástases e resposta inflamatória (GAO et al., 2013). Em 2014, o SIM cloreto de 1-benzil-2-fenil-3-(4-isopropil)-benzilimidazólio apresentou eficácia no tratamento do carcinoma hepatocelular, um dos cânceres letais mais comuns diagnosticados em todo o mundo. O sal foi capaz de reduzir o volume do tumor em 65%, sem afetar o peso dos ratos analisados (GOLAPAN et al., 2014).

Além disso, o efeito antimicrobiano de alguns SIMs vem sendo evidenciado em pesquisas com variadas espécies patogênicas, incluindo bactérias, fungos, protozoários e demais parasitas, em geral. Em 2010, demonstrou-se atividade antimalárica de sais imidazólicos e triazólicos (VLAHAKIS et al., 2010), atividade essa corroborada por outros trabalhos que demonstraram a capacidade, de alguns SIMs *N*-substituídos, de inibição do ciclo de infecção do *Plasmodium falciparum* (FARAL-TELLO et al., 2014), inclusive contra cepas cloroquina-resistentes (HEMMERT et al., 2013).

Entre os anos 2011-2012, investigou-se a ação de uma série de SIMs (1-metoxietil-3-metilimidazólio, com diferentes ânions: tetrafluoroborato [BF₄], hexafluorofosfato [PF₆], trifluoroacetato [CF₃COO], bis(trifluorometilsulfonyl)amida [Tf₂N] e metanossulfonato [OMS]), contra bactérias do gênero *Clostridium*, observando-se que todos os sais inibiram a taxa de crescimento da bactéria, e que esse efeito era dependente do ânion de cada sal, de tal forma que a efetividade de ação antibacteriana obedeceu a seguinte relação: [Tf₂N] ≥ [PF₆] > [BF₄] > [CF₃COO] > [OMS] (WANG; MALHOTRA; FRANCIS, 2011). Já foi relatado também a atividade biocida de alguns SIMs, impedindo o ataque de fungos e bactérias em materiais orgânicos (MUÑOZ-BONILLA; FERNÁNDEZ-GARCÍA, 2012). Nesse contexto, uma biomembrana com oligômeros de sais imidazólicos, com ânion cloreto, foi testada em relação à atividade antimicrobiana, apresentando um amplo espectro de ação, inclusive contra cepas de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente, *Enterococcus vancomicina*-resistente, *Staphylococcus aureus* metilicina-resistente e *Cryptococcus neoformans* fluconazol-resistente (LIU et al., 2012).

Entre os anos 2013-2014, duas séries de SIMs *N*-substituídos foram testadas em relação à capacidade de inibição de bactérias gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Aeromonas hydrophilla*), gram-positivas (*Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium perfringens*), incluindo isolados clínicos bacterianos multirresistentes, e espécies fúngicas (*Candida albicans*, *Penicillium funiculosum* e *Aspergillus fumigatus*). Os resultados preliminares mostraram que todos os sais testados apresentaram atividade antimicrobiana contra todos os micro-organismos, com faixa de CIM de 0.14 a 100.00 µg/mL (ODZAKA; SKOCIBUSIC; MARAVIC, 2013). Adicionalmente corroborando a isso, outras investigações relataram uma importante atividade antibacteriana dos SIMs-LIs (BAHNOUS et al., 2013; MESSALI et al., 2013). Ainda alguns sais polimidazólicos, com ânions cloreto e brometo, foram efetivos no tratamento *in vivo* da ceratite fúngica, com potencial ação antibiofilme, em baixas concentrações (LIU et al., 2013). Atividade anti-leveduriforme também já foi relatada para SIMs, especificamente contra *Trichosporon asahii*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*, na maioria dos casos, em concentrações inferiores aos antifúngicos fluconazol e cetoconazol, utilizados no estudo para termos de comparação (SCHREKKER et al., 2013). Mais recentemente, observou-se que a atividade antimicrobiana dos SIMs pode ser espécie-específico, já que um SIM analisado, *N,N*-bis(salicilideno)-(\pm)-*trans*-1,2-diamino-ciclohexano, teve alto potencial antibacteriano contra *Bacillus subtilis*, porém baixa efetividade contra *Escherichia coli* e *Candida albicans* e inatividade contra *Aspergillus flavus* (ELSHAARAWYA; JANIAC, 2014).

Especificamente, no que concerne a estudos dos sais imidazólicos e fungos dermatófitos, há um trabalho de 2013, no qual foi testada uma série de Lis imidazólicos substituídos com ésteres e amidas contra 20 cepas (8 bacterianas e 12 fúngicas, dentre essas uma cepa de *T. mentagrophytes*). Todos os compostos testados apresentaram baixa ação antimicrobiana, com exceção de um LI, o 1,3-dimetilimidazólio com C-4/C-5 metil-diésteres e ânion iodeto, que foi ativo contra todos os micro-organismos, na concentração de 0.5 mM, inclusive inibindo o crescimento da cepa dermatofítica analisada (GORE et al., 2013). Mais estudos com essa abordagem fazem-se necessários, visto que ainda há pouca investigação da atividade antidermatofítica dos SIMs. Um fato animador é que GHOSH e colaboradores (2014) relataram a capacidade de um LI imidazólico, o cloreto de 1-*n*-

butil-3-metilimidazólio, de regeneração da queratina, derivada da lã, o que é um achado importante, visto que se pode aliar o provável efeito antidermatofítico dos SIMs, que apresentarem tal ação, com a competência dos mesmos em auxiliar na restauração do tecido da pele danificado pela lesão, já que os dermatófitos são fungos queratinolíticos (MORAES et al., 2001).

Por conseguinte, em adição à atividade antitumoral e antimicrobiana, relatam-se ainda na literatura ações anti-inflamatória (GAO et al., 2013), antiarrítmica (LIS et al., 1987) e antifibrótica (ZHANG et al., 2009) dos SIMs. Desse modo, percebe-se variadas funções e aplicações possíveis (Fig. 17) para esses compostos, como promissoras biomoléculas.

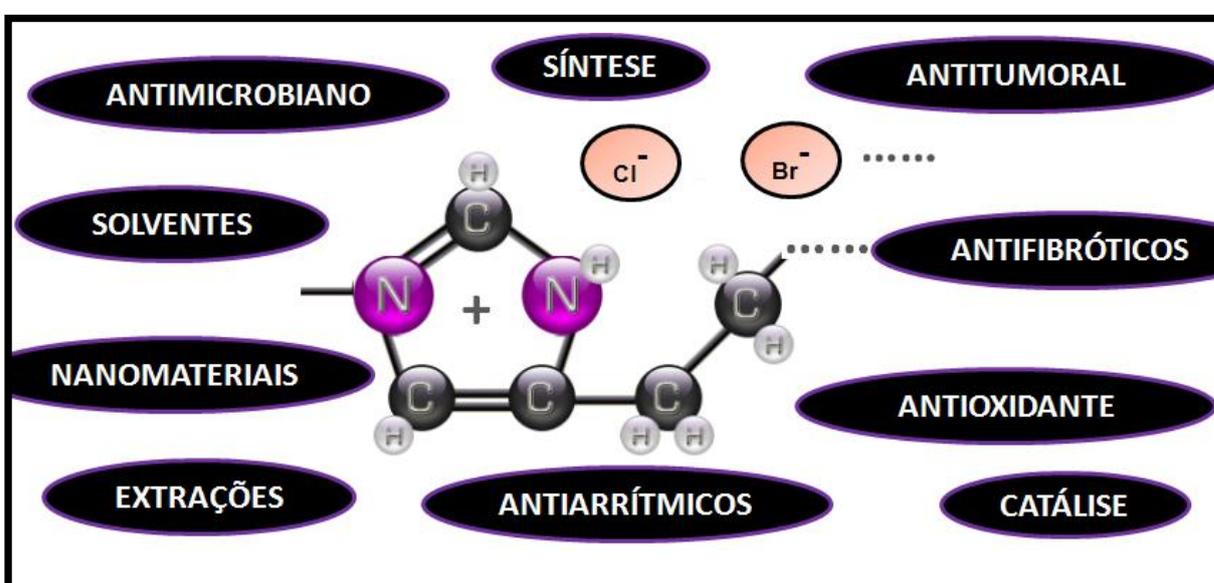


Figura 17. Figura representativa das variadas aplicações dos SIMs-LIs em diferentes áreas da ciência (FONTE: Adaptado de LIS et al., 1987; ZHANG et al., 2009; RODRIGUES, 2010; ELSHAARAWYA; JANI AK, 2014; FARAL-TELLO et al., 2014).

As atividades antimicrobianas supracitadas são dos sais imidazólicos, baseadas muitas vezes, na subclasse dos líquidos iônicos imidazólicos, porém há estudos com outros líquidos iônicos, não apenas os derivados do cátion dialquilimidazólio, mas também líquidos derivados dos cátions alquilpiridínio e tetralquilamônio (FRANZOI et al., 2011), com, da mesma forma que para os LIs imidazólicos, promissores efeitos antimicrobianos. Em 2012, a ação antimicrobiana dos líquidos iônicos não imidazólicos - acetato de trietanolamina [TEA][HOAc] e cloreto de dietanolamina [HDEA][Cl], bem como de seus complexos, foi investigada.

Os compostos apresentaram baixa atividade antibacteriana, porém ótimos resultados para a atividade antifúngica. As espécies de *Aspergillus* foram especialmente sensíveis a essas substâncias, comparadas com *Candida albicans*, *Rhodotorula* spp. e *Saccharomyces boulardii* (PETROVIC et al., 2012). No mesmo ano, um estudo relatou a atividade antibacteriana, contra bactérias gram-negativas (*Escherichia coli*), de uma série de líquidos iônicos de amônio quaternário (LI et al., 2012).

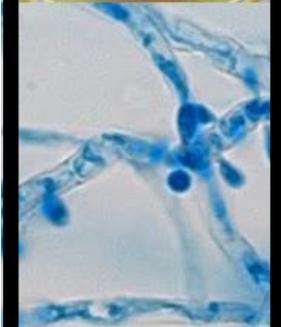
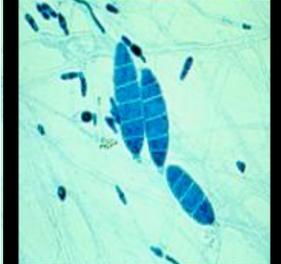
Diante de um cenário de tantas possibilidades de aplicações surge a dúvida/preocupação quanto ao potencial tóxico dos SIMs. Os SIMs brometo de 1-alquil-3-metilimidazólio ([AMIm]Br) e brometo de 1-alquil-2,3-dimetilimidazólio ([AMMIm]Br) foram avaliados quanto à toxicidade, em peixes - *Carassius auratus*, em altas diferentes concentrações - 2 e 20 mg.L⁻¹. Alterações nas atividades da superóxido dismutase, catalase, glutathione-peroxidase, nos níveis de glutathione reduzida e malondialdeído foram detectados, o que indica que esses sais, nessas concentrações avaliadas, demonstraram biotoxicidade (WANG et al., 2014). Os sais tetrafluoroborato de 1-*n*-butil-, 1-*n*-benzil- e 1-*n*-hexil-3-metilimidazólio, foram analisados quanto à toxicidade, nas concentrações 5, 50 e 500 µM, em algas marinhas (*Oocystis submarina* e *Cyclotella meneghiniana*), observando-se uma baixa toxicidade dos sais em relação às espécies de algas, e que com o acréscimo de carbonos na cadeia lateral o nível de toxicidade aumentava (LATALA et al., 2005). Demais estudos em algas, com sais com ânion brometo, também mostraram certa toxicidade e que o aumento da mesma estava diretamente relacionado com o aumento da cadeia alquílica lateral e com o tipo de ânion constituinte dos SIMs (WOONG CHO et al., 2007), o que corrobora com outros trabalhos que demonstram que quanto maior a cadeia lateral dos SIMs, há aumento do grau de toxicidade (KULACKI; LAMBERTI, 2010; MA et al., 2010). Porém, outro estudo relatou a atoxicidade de uma série de SIMs, com tamanho de cadeia lateral e ânions distintos, avaliados em células leucocitárias humanas, através de ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade (SCHREKKER et al., 2013).

Referente à fitotoxicidade, os LIs (cátion 1-etil-3-metilimidazólio [EMIM] associado com os ânions - brometo [Br], nitrato [NO₃], *p*-toluenossulfonato (tosilato) [Ts], dimetilfosfato [dMP] e metanossulfonato [OMS]) foram avaliados sobre o crescimento e desenvolvimento de plantas terrestres superiores - cevada e rabanete, observando-se uma moderada fitotoxicidade sobre essas espécies

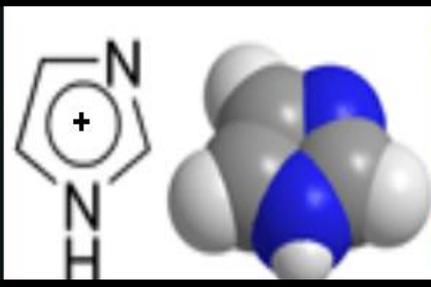
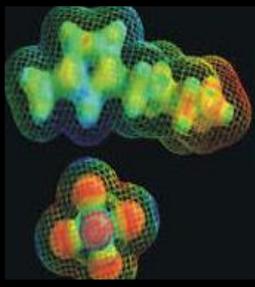
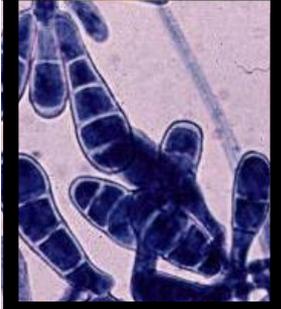
vegetais. O impacto negativo desses sais fundidos no brotamento e aspecto visual foi maior em relação à cevada e dependente da concentração, já que a toxicidade se deu a partir de concentrações de 100 mg.Kg^{-1} de solo tratado. Em relação ao efeito do ânion, os sais com $[\text{NO}_3]$ e $[\text{dMP}]$ foram os mais fitotóxicos (BICZAK et al., 2014).

Ambientalmente, apesar dos LIs serem considerados solventes vantajosos ao ecossistema pela pressão de vapor reduzida, há um certo alerta para ocasionais riscos de contaminação de águas, e, por consequência, da flora e fauna aquática, pois acredita-se que alguns SIMs não são biodegradáveis e possam acumular-se no organismo (ZHAO; LIAO; ZHANG, 2007). A real análise desses danos ainda não foi plenamente elucidada, pois cada composto pode acumular-se de modo diferente, dependendo de sua estrutura (ZHAO; LIAO; ZHANG, 2007; GORE et al., 2013).

À vista disso, a grande incerteza que cerca os potenciais riscos dos SIMs é apenas uma entre as diversas incógnitas que persistem no referente a esses compostos (GORE et al., 2013). Por serem sistemas ainda relativamente recentes (na maioria de suas aplicações) e com propriedades tão variadas, muitos detalhes importantes sobre suas interações intermoleculares, utilidades e toxicidade, tanto puros quanto em solução, ainda estão sendo investigados. É nesse contexto, que o design de novos SIMs-LIs, estruturalmente planejados, permanece como uma área emergente e repleta de possibilidades (ANDERSON; LONG, 2010).



PARTE EXPERIMENTAL



4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Sais imidazólicos

4.1.1. Síntese

Os SIMs foram sintetizados no Laboratório de Processos Tecnológicos e Catálise do Instituto de Química da UFRGS, segundo Cassol et al. (2006), Schrekker et al. (2008), Wasserscheid e Welton (2008) e Galgano (2012) compreendendo duas rotas sintéticas, que variam quanto à aplicação, dependendo do SIM a ser sintetizado:

- A primeira é uma reação de substituição nucleofílica (S_N), entre o metilimidazol, e um haleto de alquila ou metanossulfonato de alquila (obtido pela reação de um álcool com cloreto de metanossulfonila), para obter-se haletos ou metanossulfonatos do cátion metilimidazol (Fig. 18 a). De modo geral, reage-se o alquilante com o metilimidazólio. Esses são os denominados SIMs de primeira geração. Por essa rota deu-se a síntese dos seguintes SIMs: C_4MImCl , $C_4MImMeS$, $C_9MImMeS$, $C_{10}MImCl$, $(C_{10})_2MImCl$, $C_{16}MImCl$, $C_{16}MImMeS$ e $C_{18}MImCl$.

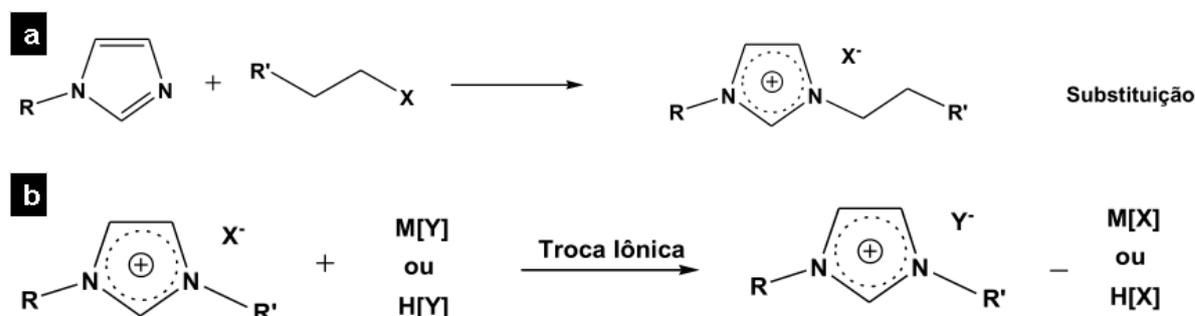


Figura 18. Esquema geral de síntese dos SIMs-LIs – (a) reações de substituição nucleofílica, nas quais R e R` representam cadeias alquílicas e X o contra-íon e (b) troca iônica, na qual R e R` representam cadeias alquílicas, X e Y o ânion e M representa um metal (FONTE: SATO, 2011).

- A segunda - reação de Finkelstein - consiste, na maioria dos casos, na reação de metátese (também conhecida como reação de dupla troca ou troca-iônica), do contra íon haleto ou metanossulfonato (Fig. 18 b), levando aos SIMs de segunda geração, contendo ânions mais volumosos. Realizou-se troca iônica utilizando-se sais metálicos de haleto, por exemplo, $Li-NTf_2$ reagindo com

C₁₆MImMeS (um SIM de 1ª geração), para obtenção do C₁₆MImNTf₂. Por essa rota deu-se a síntese dos seguintes SIMs: C₄MImOcS, C₁₆MImNTf₂ e C₁₆MImSaC.

A partir das reações realizadas, fez-se o cálculo do rendimento e a determinação da pureza dos compostos, por análise de Ressonância Magnética Nuclear (¹H-RMN) (CASSOL et al., 2006; SCHREKKER et al., 2008). Os rendimentos obtidos variaram de 70 a 90% e os dados espectrais estavam de acordo com os já publicados na literatura (CASSOL et al., 2006; SCHREKKER et al., 2008), sendo que a pureza para todos os sais foi ≥ 98%. Esses sais imidazólicos estão sendo patenteados pelo nosso grupo de pesquisa (Grupo Multidisciplinar em Química Medica e Microbiológica - MUMIC), em relação à atividade antifúngica e antibiofilme (Número do registro: BR0209473, data de depósito: 19/08/2013 e Instituição de registro: Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI).

4.1.2. Estrutura e propriedades químicas

Os SIMs sintetizados foram resultantes de uma combinação entre diferentes ânions e substituintes alquílicos (cadeias laterais) do cátion metilimidazólio (Fig. 19).

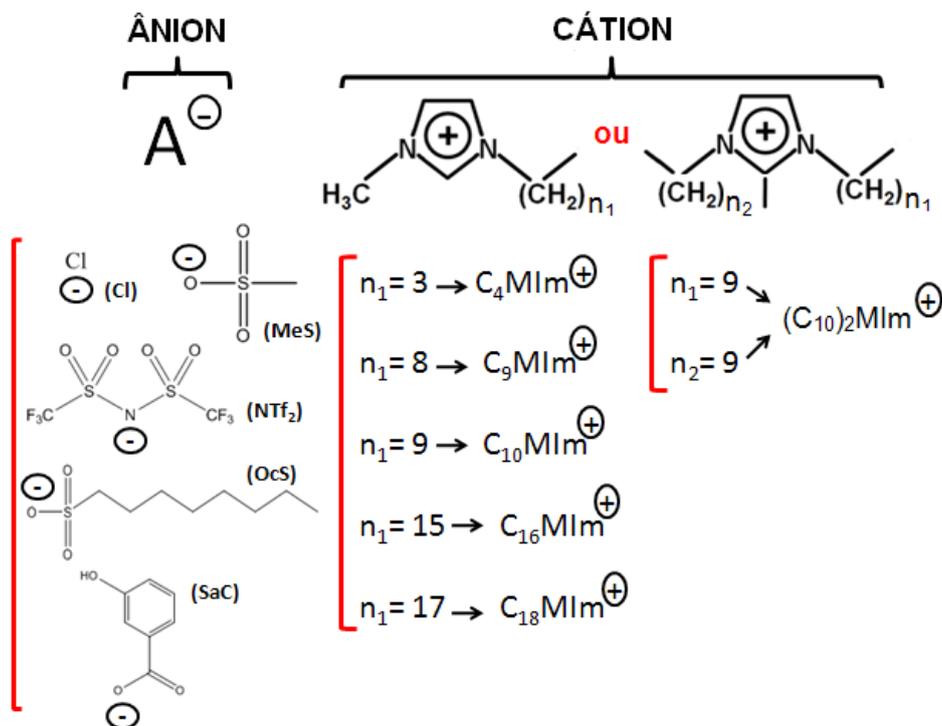


Figura 19. Combinações entre cátions e ânions dos SIMs estudados. MIm: metilimidazólio, [Cl]: ânion cloreto, [MeS]: ânion metanossulfonato ou mesilato, [NTf₂]: ânion bis(trifluorometilsulfonyl)amida ou N-triflato, [OcS]: ânion octanossulfonato, [SaC]: ânion salicilato.

No total uma série de 11 SIMs foi sintetizada (Tab.1), resultante de combinações individuais entre cátions e ânions (Fig. 19).

Tabela 1. Propriedades químicas dos compostos estudados.

Sais imidazólicos (códigos)	Nome químico	Fórmula molecular	Massa molar (g.mol ⁻¹)	Estrutura química	Estado físico	Fonte
C₄MImCl	cloreto de 1- <i>n</i> -butil-3-metilimidazólio	C ₈ H ₁₅ ClN ₂	174.67	Fig. 20	* Líquido viscoso	CHEM SPIDER ^a
C₄MImMeS	metanossulfonato de 1- <i>n</i> -butil-3-metilimidazólio	C ₉ H ₁₈ N ₂ O ₃ S	234.31	Fig. 21	Sal sólido	CHEM SPIDER ^b
C₄MImOcS	octanossulfonato de 1- <i>n</i> -butil-3-metilimidazólio	C ₁₆ H ₃₂ N ₂ O ₃ S	332.50	Fig. 22	Sal sólido	CHEM SPIDER ^c
C₉MImMeS	metanossulfonato de 1- <i>n</i> -ciclohexilpropil-3-metilimidazólio	C ₁₄ H ₂₆ N ₂ O ₃ S	302.46	Fig. 23	Sal sólido	CHEM DRAW Std 14.0
C₁₀MImCl	cloreto de 1- <i>n</i> -decil-3-metilimidazólio	C ₁₄ H ₂₇ ClN ₂	258.83	Fig. 24	* Líquido viscoso	CHEM SPIDER ^d
(C₁₀)₂MImCl	cloreto de 1,3-di- <i>n</i> -decil-2-metilimidazólio	C ₂₄ H ₄₇ ClN ₂	399.09	Fig. 25	Sal sólido	CHEM SPIDER ^e
C₁₆MImCl	cloreto de 1- <i>n</i> -hexadecil-3-metilimidazólio	C ₂₀ H ₃₉ ClN ₂	342.99	Fig. 26	Sal sólido	CHEM SPIDER ^f
C₁₆MImMeS	metanossulfonato de 1- <i>n</i> -hexadecil-3-metilimidazólio	C ₂₁ H ₄₂ N ₂ O ₃ S	402.32	Fig. 27	Sal sólido	CHEM DRAW Std 14.0
C₁₆MImNTf₂	bis(trifluorometil sulfonil)amida de 1- <i>n</i> -hexadecil-3-metilimidazólio	C ₂₂ H ₃₉ F ₆ N ₃ O ₄ S ₂	587.71	Fig. 28	Sal sólido	CHEM DRAW Std 14.0

Tabela 1. Propriedades químicas dos compostos estudados (continuação).

Sais imidazólicos (códigos)	Nome químico	Fórmula molecular	Massa molar (g.mol ⁻¹)	Estrutura química	Estado físico	Fonte
C₁₆MImSaC	Hidroxibenzoato (salicilato) de 1- <i>n</i> -hexadecil-3-metilimidazólio	C ₂₇ H ₄₄ N ₂ O ₃	444.67	Fig. 29	Sal sólido	CHEM DRAW Std 14.0
C₁₈MImCl	cloreto de 1- <i>n</i> -octadecil-3-metilimidazólio	C ₂₂ H ₄₃ ClN ₂	371.04	Fig. 30	Sal sólido	CHEM SPIDER ^a

* líquido iônico imidazólico a temperatura ambiente.

** As abreviaturas são representadas do seguinte modo: ([C_nMIm]⁺ [ânion]⁻), simplificadaamente C_nMIm[ânion], no qual n= número de carbonos na cadeia lateral, MIm= metilimidazólio, seguido do ânion associado).

^a <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2015917.html?rid=78f17672-67c1-48d4-b9d9-8225be0cf28f>

^b <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.9667187.html>

^c <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.26667679.html?rid=4e29a27f-0143-4dec-91f9-bee04000d44b>

^d <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2015981.html?rid=8f4d5ef3-7eb6-430e-8c56-4f47a8162a2d>

^e <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2056267.html?rid=4f11bc7d-26d0-495d-8156-c639583c2cc3>

^f <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2015987.html?rid=933e5923-b596-4afd-9f71-b8b2c520dc88>

^g <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2015989.html?rid=a4ca96e9-4b5a-49ea-b0fb-4a3356ee9855>

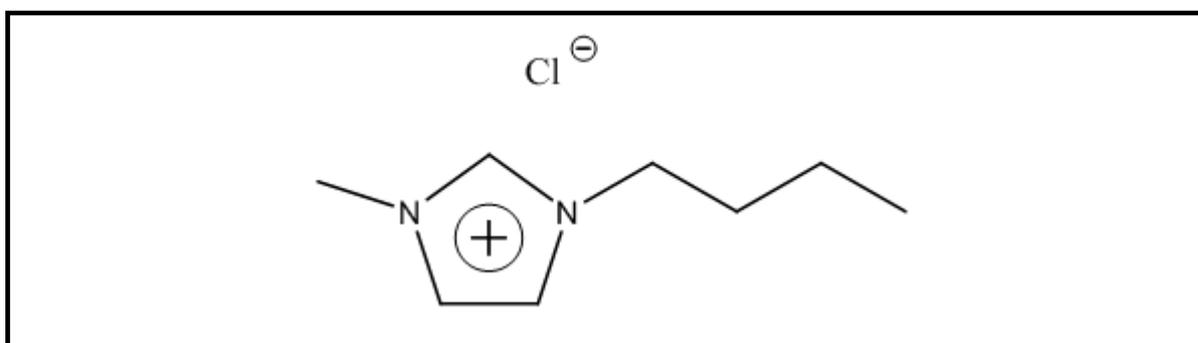


Figura 20. Estrutura química do sal imidazólico (líquido iônico imidazólico a temperatura ambiente) C₄MImCl (FONTE: CHEMDRAW Std 14.0).

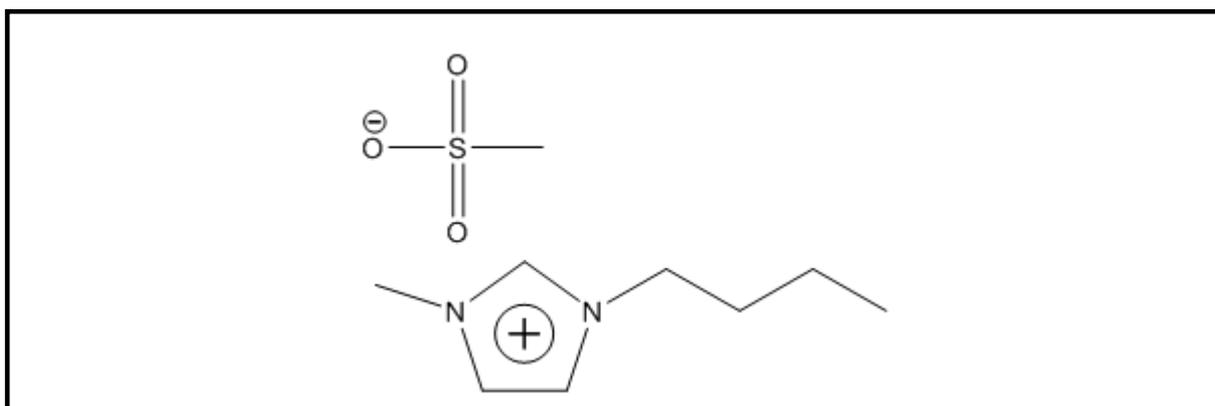


Figura 21. Estrutura química do sal imidazólico C₄MImMeS (FONTE: CHEMDRAW Std 14.0).

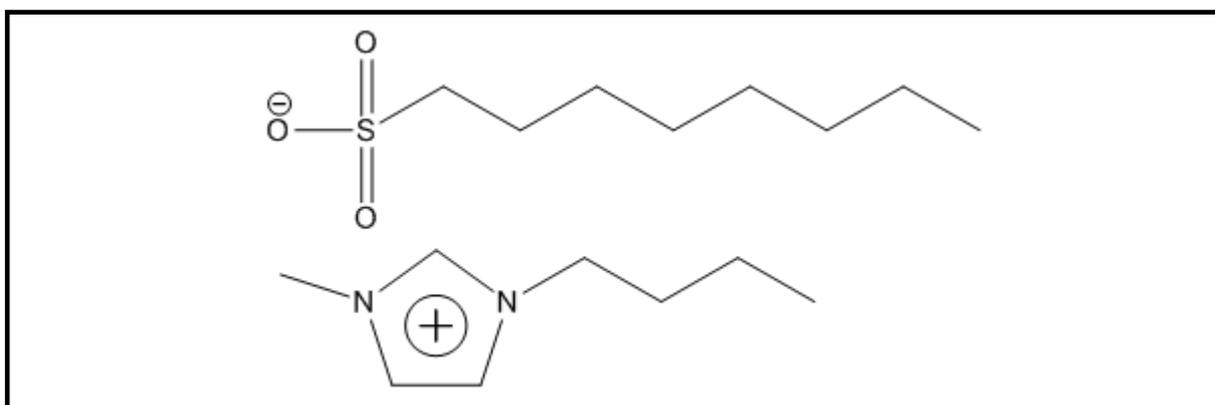


Figura 22. Estrutura química do sal imidazólico C₄MImOcS (FONTE: CHEMDRAW Std 14.0).

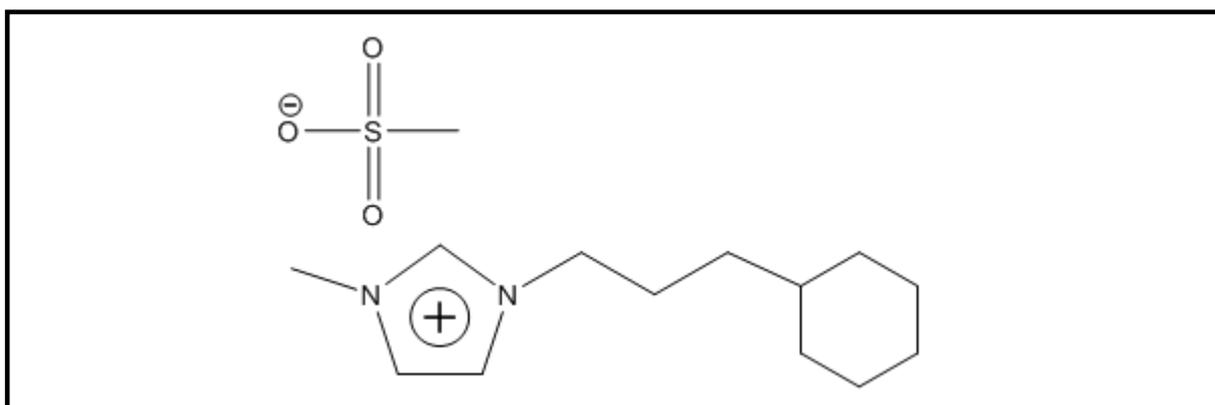


Figura 23. Estrutura química do sal imidazólico C₉MImMeS (FONTE: CHEMDRAW Std 14.0).

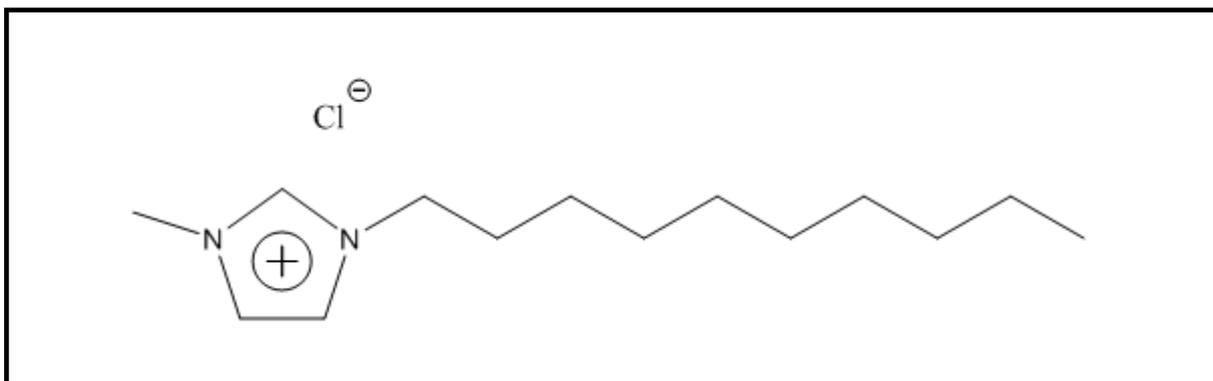


Figura 24. Estrutura química do sal imidazólico (líquido iônico imidazólico a temperatura ambiente) $C_{10}MImCl$ (FONTE: CHEMDRAW Std 14.0).

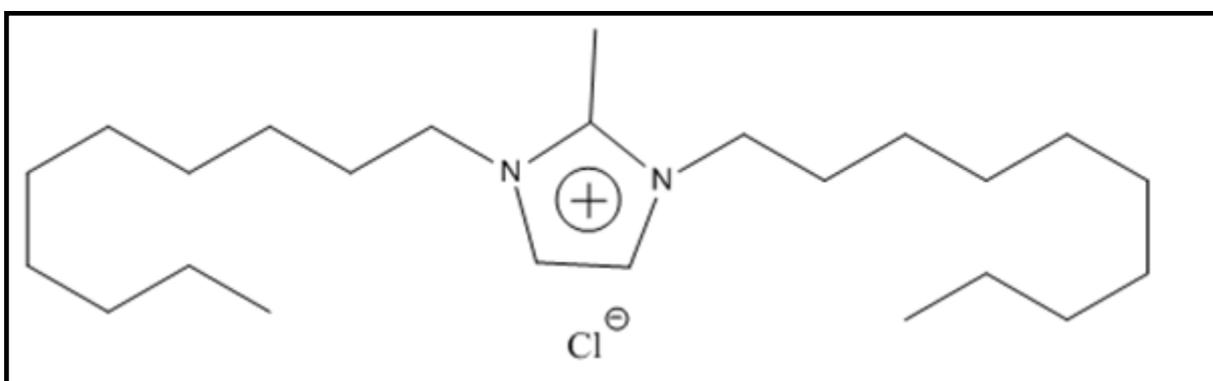


Figura 25. Estrutura química do sal imidazólico $(C_{10})_2MImCl$ (FONTE: CHEMDRAW Std 14.0).

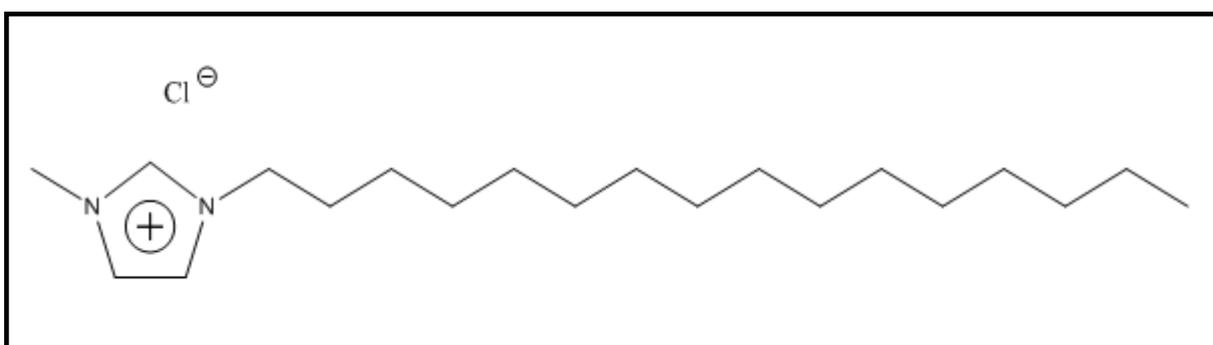


Figura 26. Estrutura química do sal imidazólico $C_{16}MImCl$ (FONTE: CHEMDRAW Std 14.0).

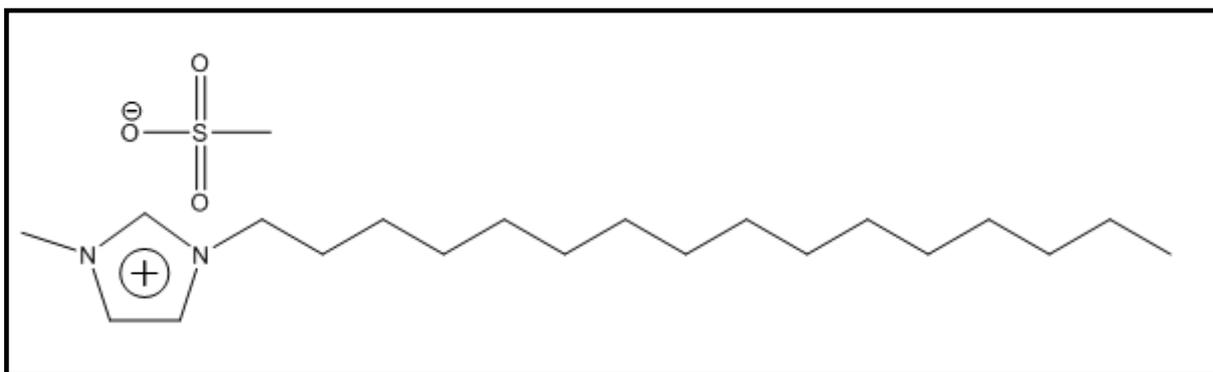


Figura 27. Estrutura química do sal imidazólico $C_{16}MImMeS$ (FONTE: CHEMDRAW Std 14.0).

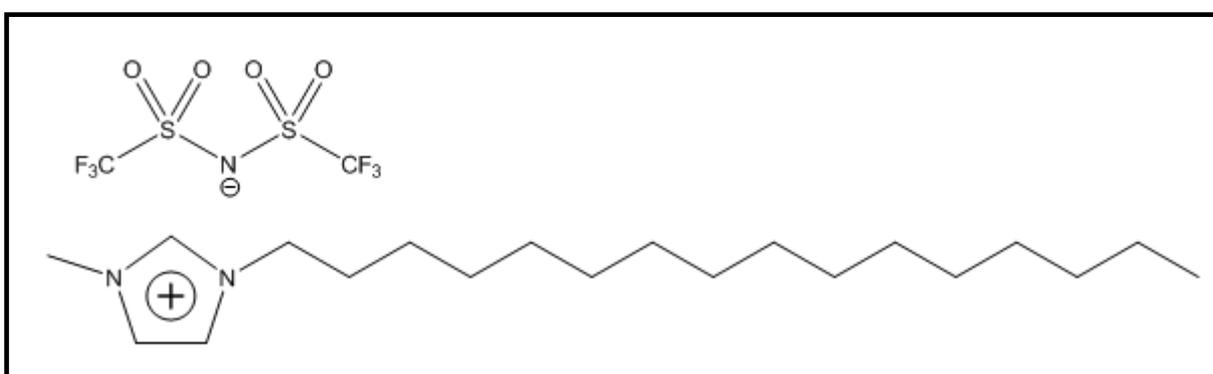


Figura 28. Estrutura química do sal imidazólico $C_{16}MImNTf_2$ ou $C_{16}MImN((SO_2)CF_3)_2$ (FONTE: CHEMDRAW Std 14.0).

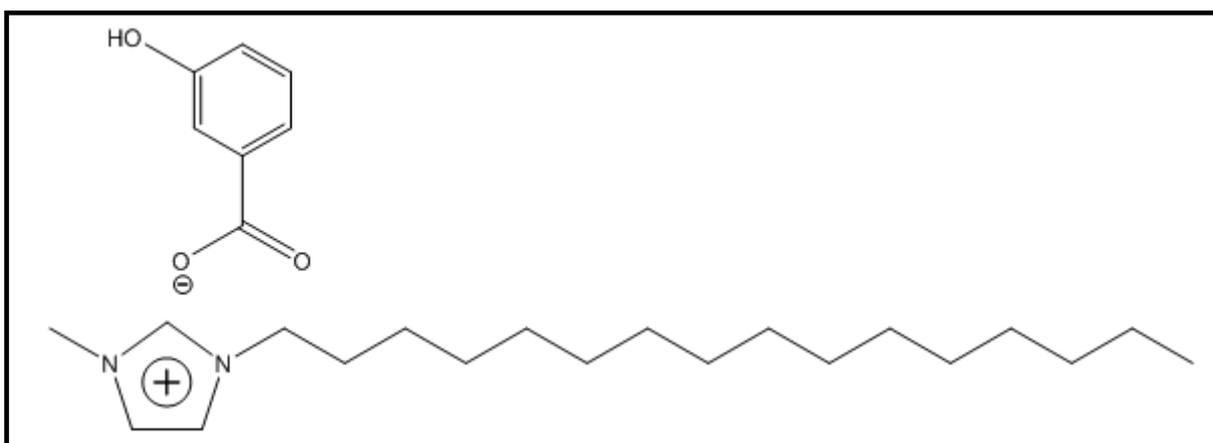


Figura 29. Estrutura química do sal imidazólico $C_{16}MImSaC$ (FONTE: CHEMDRAW Std 14.0).

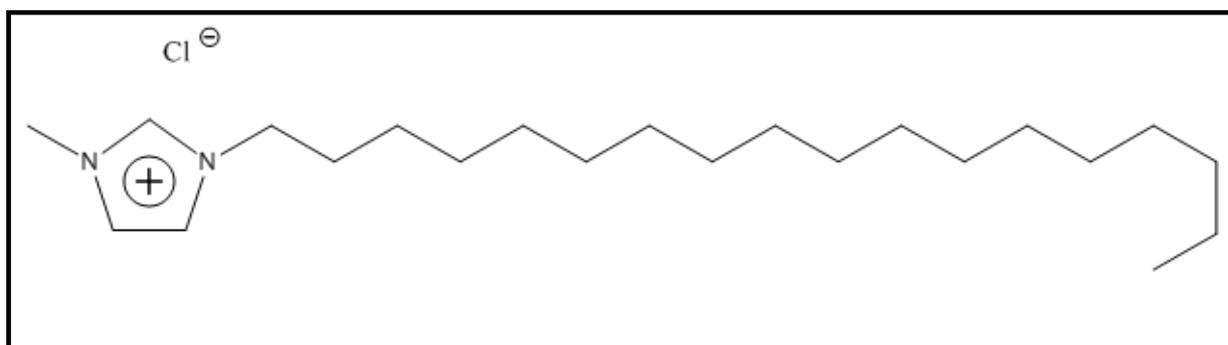


Figura 30. Estrutura química do sal imidazólico C₁₈MImCl (FONTE: CHEMDRAW Std 14.0).

4.1.3. Preparo das soluções

Todos os SIMs foram dissolvidos em água purificada esterilizada na concentração de 1.00 mg.mL⁻¹, seguido de sonicação, por cerca de 15 minutos. Posteriormente, foram realizadas diluições, também em água deionizada (millique) estéril, até as concentrações desejadas em cada teste. As soluções dos SIMs foram armazenadas sob-refrigeração e previamente a cada ensaio, foram sonicadas.

4.2. Agentes antifúngicos e preparo das soluções

Todos os antifúngicos foram adquiridos comercialmente e soluções-estoque de terbinafina (TBF; pureza ≥ 97%; Cristália - São Paulo, Brasil), griseofulvina (GSF; pureza ≥ 97%; Wallace Pharmaceuticals - Mumbai, Índia), cetoconazol (CTZ; pureza ≥ 96%; All Química - São Paulo, Brasil), anfotericina B (AFB; pureza ≥ 97%; Cristália - São Paulo, Brasil) e anidulafungina (ANF; pureza ≥ 97%; Cristália - São Paulo, Brasil) foram feitas conforme metodologia padrão do preparo de soluções antifúngicas, do protocolo de referência em relação aos testes de suscetibilidade (diluição em caldo), para fungos filamentosos (dermatófitos e não-dermatófitos) - Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI M38-A2, 2008, p. 3). Os antifúngicos inicialmente foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich; 4.80 mg do pó do antifúngico em 3.0 mL de DMSO), obtendo-se soluções na concentração de 1.600 µg/mL. Posteriormente, diluições seriadas em meio RPMI 1640 (contendo L-glutamina, sem bicarbonato de sódio, tamponado a pH 7.0 com ácido 3-morfolinopropanosulfônico (MOPS; 0.165 mol.L⁻¹, Sigma-Aldrich) foram conduzidas a fim de que a concentração final de cada antifúngico fosse 128.00 µg/mL em DMSO a 1%. Quando adicionada na microplaca de poliestireno para

avaliação da suscetibilidade, cada solução antifúngica passa apresentar concentração de 64.00 µg/mL em DMSO 0.5%, na primeira microdiluição, já que ocorre diluições 1:2 no teste.

Quanto ao armazenamento, as soluções-estoque foram acondicionadas em vials âmbar de polietileno, os quais foram cuidadosamente vedados e estocados a -4 °C (Ultra Freezer Vertical - Modelo IULT 335D).

4.3. Fungos dermatófitos

O total de 45 isolados clínicos dermatofíticos (oriundos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA) foi avaliado nesse estudo: nove *Microsporum canis* (MCA 01, MCA 29, MCA 32, MCA 33, MCA 36*, MCA W3, MCA 38, MCA 39, MCA 40*), doze *Microsporum gypseum* (MGY 42, MGY 45, MGY 46, MGY 48, MGY 49, MGY 50, MGY 51, MGY 52, MGY 53, MGY 54, MGY 57, MGY 58*), doze *Trichophyton mentagrophytes* (TME 16*, TME 18, TME 31, TME 32, TME 33, TME 34*, TME 35, TME 36, TME 38, TME 40, TME 44, TME 46) e doze *Trichophyton rubrum* (TRU 20, TRU 23, TRU 25*, TRU 40, TRU 42, TRU 43*, TRU 46, TRU 48, TRU 49, TRU 50, TRU 52, TRU 53). Esses isolados clínicos foram obtidos a partir de infecções dermatofíticas variadas (*tinea capitis*, *tinea corporis*, *tinea cruris*, *tinea unguium*, *tinea pedis*, entre outras), e estão depositados na micoteca do Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada (GPMA) da UFRGS, em Porto Alegre.

Trinta e oito isolados foram sensíveis aos agentes antifúngicos comerciais avaliados no teste de suscetibilidade (TBF, GSF e CTZ), e sete foram identificados como resistentes *in vitro*, a pelo menos dois antifúngicos de classes diferentes, sendo assim caracterizados como isolados dermatofíticos multirresistentes (MCA 36*, MCA 40*, MGY 58*, TME 16*, TME 34*, TRU 25* e TRU 43*) - as abreviaturas possuem um asterisco (*) para diferenciação, como isolados mutantes. Considerando que ainda não há *breakpoints* completamente determinados para as espécies dermatofíticas na CLSI (M38-A2; 2008), em relação a todos os antifúngicos, o critério de resistência, nesse estudo, foi estabelecido de acordo com o aumento relevante dos valores da CIM para os antifúngicos TBF, GSF e CTZ, padronizando-se as seguintes concentrações para classificação de resistência: TBF: CIM ≥ 1.00 µg/mL, GSF: CIM ≥ 4.00 µg/mL e CTZ: CIM ≥ 8.00 µg/mL (concentrações

consideravelmente mais altas do que as observadas para os demais isolados dermatofíticos sensíveis ao tratamento *in vitro*).

4.4. Avaliação do potencial antidermatofítico

4.4.1. Teste de suscetibilidade

4.4.1.1. SIMs selecionados para o estudo

Todos os SIMs apresentados na tabela 1 (C₄MImCl, C₄MImMeS, C₄MImOcS, C₉MImMeS, C₁₀MImCl, (C₁₀)₂MImCl, C₁₆MImCl, C₁₆MImMeS, C₁₆MImNTf₂, C₁₆MImSaC e C₁₈MImCl). Preparo das soluções conforme item 4.1.3. (Preparo das soluções).

4.4.1.2. Agentes antifúngicos selecionados para o estudo

Terbinafina, griseofulvina e cetoconazol. A procedência, a pureza e o preparo das soluções estão indicados no item 4.2. (Agentes antifúngicos e preparo das soluções).

4.4.1.3. Isolados clínicos dermatofíticos selecionados para o estudo

Todos os 45 isolados clínicos dermatofíticos (sensíveis e multirresistentes), indicados no item 4.3. (Fungos dermatófitos).

4.4.1.4. Técnica

4.4.1.4.1. Preparo do inóculo fúngico

O preparo dos inóculos foi conduzido seguindo-se recomendações do protocolo da CLSI (M38-A2; 2008; p. 6), com modificações (FERNÁNDEZ-TORRES et al., 2002; FERNÁNDEZ-TORRES, 2005). Os inóculos de todos os isolados dermatofíticos estudados foram procedentes de subcultivo em placas com ABD (Pronadisa, Madrid, Espanha), as quais foram incubadas entre 4 a 14 dias, em temperatura de 30 °C (estufa DE LEO). As colônias foram cobertas com aproximadamente 5.0 mL de salina estéril 0.85% e cuidadosamente, com uma alça de drigalski estéril, homogeneizadas com a salina. A suspensão fúngica resultante, de conídios e fragmentos de hifas, foi então transferida, com o auxílio de pipeta de Pasteur estéril, para tubo de vidro estéril, o qual foi deixado em repouso, à

temperatura ambiente, por 10 minutos (min.). As partículas mais pesadas sedimentaram e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de vidro estéril, o qual foi homogeneizado em vórtex (agitador mini-vortex PV-1, Jimeno), por 15 segundos. A turbidez das suspensões foi determinada a 530 nm, em espectrofotômetro UV visível (Biospectro SP-220), admitindo-se leituras de densidade ótica com transmitância entre 80 a 85%, ajustando-se quando necessário. A partir dessa suspensão com turbidez previamente determinada, realizou-se diluição 1:50 em meio RPMI 1640 (contendo L-glutamina, sem bicarbonato de sódio, tamponado a pH 7.0 com MOPS 0.165 mol.L⁻¹; Sigma-Aldrich), obtendo-se o inóculo dermatofítico com concentração final de 2.0 x 10³ a 6.8 x 10³ UFC.mL⁻¹ (concentração 2 x maior que a preconizada para o teste de suscetibilidade, já que ocorre diluição 1:2 no momento da inoculação na microplaca do referido ensaio).

O inóculo leveduriforme das cepas-referência (*Candida albicans* ATCC 18804, *Candida albicans* ATCC 24433 e *Candida tropicalis* 750), utilizadas no teste de suscetibilidade para o controle de qualidade do mesmo, foi feito conforme o protocolo da CLSI (M27-A3; 2008; p. 10). As leveduras foram subcultivadas em ASD, com incubação por 24 horas, a 30 °C. Cinco colônias de cada cultura foram adicionadas em um tubo de vidro estéril com salina 0.85% também estéril, seguindo agitação em vórtex por 15 segundos. A turbidez da suspensão fúngica foi ajustada espectrofotometricamente (Biospectro SP-220) a 530 nm, comparando-se com a densidade celular da suspensão padrão 0.5 MacFarland. A partir dessa suspensão com turbidez devidamente padronizada, fez-se uma diluição 1:50 e posteriormente, 1:20 em meio RPMI 1640 (contendo L-glutamina, sem bicarbonato de sódio, tamponado a pH 7.0 com MOPS 0.165 mol.L⁻¹; Sigma-Aldrich), obtendo-se o inóculo leveduriforme com concentração final de 1.0 x 10³ a 5.0 x 10³ UFC.mL⁻¹ (concentração 2 x maior que a preconizada para o teste de suscetibilidade, já que ocorre diluição 1:2 no momento da inoculação na microplaca do referido ensaio).

4.4.1.4.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM)

Anteriormente a determinação da CIM e CFM, realizou-se um *screening* de atividade antifúngica para todos os SIMs, testando-os em uma única e alta concentração – 500.00 µg.mL⁻¹, para uma avaliação inicial da capacidade

antidermatófítica dos mesmos. Especificamente nesse *screening* testou-se somente isolados sensíveis, cinco de cada espécie, ou seja, 5 isolados de *M. canis*, 5 de *M. gypseum*, 5 de *T. mentagrophytes* e 5 de *T. rubrum*. Para determinação da CIM e CFM, tal como já especificado no item (4.4.1.3.) todos os 45 isolados clínicos dermatofíticos (sensíveis e multirresistentes) foram utilizados.

A CIM foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com as diretrizes da norma CLSI, documento M38-A2 (2008). Para o ensaio utilizou-se microplacas de poliestireno de 96 poços, com fundo em forma de “U” (ALAMAR®, Diadema, São Paulo, Brasil). Inicialmente, pipetou-se 100 µL do meio de cultura - meio RPMI 1640 (contendo *L*-glutamina, sem bicarbonato de sódio, tamponado a pH 7.0 com MOPS 0.165 mol.L⁻¹; Sigma-Aldrich) nos poços da microplaca, da 2ª coluna até a 11ª e 200 µL nos poços da 12ª coluna. Uma alíquota de 200 µL da solução dos SIMs a serem testados e soluções dos antifúngicos foi adicionada na 1ª coluna da microplaca, procedendo-se a microdiluição seriada, pela transferência de 100 µL da 1ª coluna para a 2ª; da 2ª para a 3ª e assim sucessivamente até a 10ª coluna, desprezando-se 100 µL. Em decorrência desse processo, em cada coluna ocorre uma diluição 1:2 com o meio de cultura, de modo que a concentração das soluções-teste e antifúngicos, a cada microdiluição, cai pela metade. Por fim, adicionou-se 100 µL do inóculo, previamente preparado conforme item 4.4.1.4.1. (Preparo do inóculo fúngico), da 1ª até a 11ª coluna, ficando cada poço da microplaca com um volume final de 200 µL. Desse modo, no ensaio, há a microdiluição para determinação da CIM, da 1ª até a 10ª coluna, há o controle de viabilidade do crescimento fúngico (controle positivo, 11ª coluna, meio de cultura e inóculo) e o controle de esterilidade do meio de cultura (controle negativo, 12ª coluna, somente meio RPMI 1640). No caso das soluções de antifúngicos, nas quais o diluente não foi somente a água purificada esterilizada e sim DMSO na concentração final de 1%, fez-se também, então, o controle do diluente (solução de DMSO 1% e inóculo fúngico) para avaliação de uma possível interferência tóxica do solvente contra as espécies fúngicas.

As microplacas foram incubadas a 30 °C (estufa DE LEO) e a leitura, após 4 dias (96 h) de incubação, foi realizada visualmente, considerando-se para determinação da CIM, 100% de inibição do crescimento fúngico, sempre em comparação com o crescimento do controle positivo. Dessa forma, considerou-se como CIM a menor concentração dos compostos capaz de inibir totalmente o

crescimento das espécies fúngicas utilizadas no ensaio. A faixa de concentração testada para os antifúngicos (TBF, GSF, CTZ) e SIMs foi 32.00 – 0.03 µg/mL e 100.00 – 0.02 µg/mL, respectivamente. A morfologia do crescimento dos fungos na microplaca foi monitorada, objetivando-se investigar a capacidade dos SIMs de ocasionarem alteração fenotípica no crescimento dermatofítico, pós-tratamento *in vitro* com esses compostos, comparando-se com o crescimento do controle fúngico sem tratamento, para isso a microplaca ficou incubando por 14 dias. O teste foi realizado em duplicata e o resultado dos valores de CIM expresso em µg/mL e nmol/mL. A CIM em nmol/mL foi obtida pela divisão do valor da CIM em µg/mL pela massa molar de cada composto e multiplicação desse valor resultante por 1000. O ensaio também foi conduzido com cepas leveduriformes de referência, para certificação das condições experimentais, permitindo uma segura reprodutibilidade. A leitura para determinação da CIM das microplacas com as leveduras foi realizada em 24 horas. Os *breakpoints* foram interpretados conforme CLSI M27-S4 (2012).

O mesmo procedimento da técnica supracitada foi realizado utilizando-se como meio de cultura Caldo Sabouraud Dextrose (CSD; meio líquido Sabouraud; HIMEDIA), para alguns isolados dermatofíticos, em relação aos sais imidazólicos e cetoconazol, com a intenção de observarem-se possíveis interações entre as substâncias testadas e o meio de cultura, comparando-se os resultados com o meio RPMI 1640.

Para determinação da CFM, alíquotas da microplaca de poliestireno do teste de suscetibilidade, das microdiluições seriadas correspondentes à CIM, 2xCIM e 4xCIM de cada composto (SIMs e antifúngicos) foram subcultivadas em placas de ABD (Pronadisa, Madrid, Espanha), as quais foram incubadas a 30 °C durante 96 h e analisadas. A CFM foi definida como a concentração mais baixa da substância capaz de permitir o crescimento de no máximo 3 colônias do fungo (matando \geq 99,5% do inóculo dermatofítico) e exercendo, então, efeito fungicida (ESPINEL-INGROFF et al., 2002). Se houve crescimento de mais de 3 colônias na CIM, 2xCIM e 4xCIM, o composto foi considerado fungistático, para essas concentrações analisadas. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.4.1.5. Estatística

A análise estatística das CIM's dos SIMs e antifúngicos (TBF, GSF e CTZ), para a comparação de efetividade de potencial antidermatofítico, foi realizada pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn, para comparações múltiplas envolvendo todos os pares de tratamento. Diferenças entre as medianas das CIM's foram consideradas significativas quando $p < 0.05$. As análises foram conduzidas em Statistica v 10.0 software estatístico (Statsoft, Tulsa).

4.4.2. Análise do efeito sobre a micromorfologia dermatofítica

4.4.2.1. SIMs selecionados para o estudo

C₁₆MImCl, C₁₆MImMeS, C₁₆MImNTf₂ - os três SIMs mais efetivos (com os menores valores de CIM contra todos os dermatófitos) e que apresentam o mesmo tamanho de cadeia lateral (16 carbonos), com diferentes ânions. Preparo das soluções conforme item 4.1.3. (Preparo das soluções).

4.4.2.2. Isolados clínicos dermatofíticos selecionados para o estudo

Trichophyton mentagrophytes (TME 16*) – dermatófito resistente *in vitro* aos três antifúngicos avaliados no teste de suscetibilidade (TBF, GSF e CTZ).

4.4.2.3. Microscopia ótica (MO)

4.4.2.3.1. Técnica

A avaliação das alterações micromorfológicas principalmente nas hifas de *T. mentagrophytes*, foi realizada pós-tratamento *in vitro*, com os 3 SIMs, em concentrações sub-inibitórias (C₁₆MImCl – 0.78 µg/mL, C₁₆MImMeS – 0.39 µg/mL, C₁₆MImNTf₂ – 1.56 µg/mL), durante quatro dias de incubação a 30 °C. Amostras de células dermatofíticas, a partir de cada tratamento, foram cuidadosamente colocadas em lâminas de vidro. Posteriormente, em cada lâmina foi adicionada uma gota de solução de KOH a 10%. As lâminas, em duplicata, foram observadas no microscópio óptico (Olympus® modelo CH-30, Japão), em aumento de 400x, para análise de possíveis anomalias morfológicas, comparadas com o controle fúngico sem tratamento (DALLA LANA, 2014).

4.4.2.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

4.4.2.4.1. Técnica

Seguiu-se metodologia de SIONOV et al. (2005) e INOUYE, et al. (2007), com modificações. Alíquotas de 20 µL de uma suspensão do inóculo fúngico de TME 16* (modo de preparo conforme item 4.4.1.4.1. (Preparo do inóculo fúngico)) tratado com cada SIM, em concentrações sub-inibitórias (C₁₆MImCl – 0.78 µg/mL, C₁₆MImMeS – 0.39 µg/mL, C₁₆MImNTf₂ – 1.56 µg/mL), por 4 dias de incubação a 30 °C (estufa DE LEO), foram transferidas para placa de petri com ABD. Um bloco de ABD foi colocado sobre as alíquotas e em cima de cada bloco dispôs-se uma lamínula estéril (microcultivo). Incubaram-se as placas por 24 h a 30 °C (estufa DE LEO). Posteriormente, as lamínulas foram retiradas das placas de Petri e colocadas em placa de cultura de células de 12 poços (o lado da lamínula que ficou em contato com o bloco de agar foi colocado para cima na microplaca). Procedeu-se a pré-fixação com aldeído, adicionando-se em cada poço da microplaca 500 µL do fixador Karnovsky modificado (composto por glutaraldeído 2.5% e formaldeído 2.5%, em tampão cacodilato de sódio 0.05 M, pH 7.2). As lamínulas ficaram submersas nessa solução por 24 h, na geladeira (Consul), a 4 °C. As amostras pré-fixadas foram lavadas com tampão cacodilato 0.05 M, pH 7.2 (3 vezes consecutivas de 10 min.) e, depois foram deixadas, por 1 h, em contato com solução de tetróxido de Ósmio (OsO₄) 2%, diluído em tampão cacodilato (1:1), a temperatura ambiente, em uma capela de fluxo laminar vertical (modelo MA1500/90), para fixação completa. Decorrido o tempo de uma hora, as amostras já fixadas foram lavadas com água destilada 3 vezes, por 3 minutos, e a seguir passaram por processo de desidratação, com concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%; Merck) e secagem em aparelho de ponto crítico (Critical Point Dryer - Baltec CPD 030). Por fim, as amostras foram coladas em *stubs* de alumínio, levadas ao metalizador (JEOL Ion Sputter JFC 1100), revestidas com ouro e analisadas em microscópio eletrônico de varredura Carl Zeiss MEV Evo-50, com ampliações de 4kX a 49kX, corrente 1-5 picoAmpere, tensão de aceleração de 5kV e distância de trabalho de 7.5 mm.

4.4.3. Análise do dano celular dermatofítico

4.4.3.1. SIMs selecionados para o estudo

C₁₆MImCl, C₁₆MImMeS, C₁₆MImNTf₂ - os três SIMs mais efetivos (com os menores valores de CIM contra todos os dermatófitos) e que apresentam o mesmo tamanho de cadeia lateral (16 carbonos), com diferentes ânions. Preparo das soluções conforme item 4.1.3. (Preparo das soluções).

4.4.3.2. Agente antifúngico selecionado para o estudo

Cetoconazol - a procedência, a pureza e o preparo da solução estão indicados no item 4.2. (Agentes antifúngicos e preparo das soluções).

4.4.3.3. Isolados clínicos dermatofíticos selecionados para o estudo

Todos os sete isolados dermatofíticos multirresistentes (MCA 36*, MCA 40*, MGY 58*, TME 16*, TME 34*, TRU 25*, TRU 43*).

4.4.3.4. Técnica

Seguiu-se metodologia de MELETIADIS et al. (2000) e CHIOU et al. (2001), com modificações. Após 4 dias de incubação das microplacas do teste de suscetibilidade (item 4.4.1. Teste de suscetibilidade) e após leitura visual das CIM's, o sobrenadante foi retirado e descartado. Adicionou-se, sobre as células dermatofíticas resultantes, 150 µL do corante brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT; Sigma-Aldrich) (solução aquosa de MTT 0.05 mg.mL⁻¹ em purificada esterilizada), seguido por incubação a 30 °C por 24 h (estufa DE LEO). Posteriormente, o sobrenadante foi retirado, descartado e 150 µL de álcool isopropílico (Sigma-Aldrich) foi acrescentado sobre as células coradas, homogeneizando-se cuidadosamente, sendo que a cor das células foi passando para o solvente, o qual é transferido (150 µL) para outra microplaca de poliestireno de 96 poços de fundo chato. Fez-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro leitor de placas (Envision 2014 Multilabel Reader, PerkinElmer, USA), a 570 nm e 690 nm (interferências). A percentagem de dano celular (DC%) foi calculada por meio da equação: $DC\% = 1 - [(A_{570\text{ nm}} - A_{690\text{ nm, do tratamento}})/(A_{570\text{ nm}} - A_{690})]$

nm, do controle sem tratamento)]X100 e expressa em função da CIM, dos SIMs analisados e do cetoconazol. O teste foi realizado em duplicata. O fundamento da técnica consiste em utilizar esse método colorimétrico para mensuração da atividade metabólica das espécies fúngicas, já que o MTT, sal tetrazólico originalmente amarelo, é clivado por desidrogenases mitocondriais, quando as células estão ativas, formando um derivado formazano de cor púrpura, que é detectado espectrofotometricamente a 570 nm (HANSEN; NIELSEN; BERG, 1989).

4.4.3.5. Estatística

Aplicou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando significância quando $p < 0.05$. As análises foram conduzidas em Statistica v 10.0 software estatístico (Statsoft, Tulsa).

4.4.4. Determinação das curvas de morte (*time kill assay*)

4.4.4.1. SIMs selecionados para o estudo

C₁₆MImMeS – o único SIM que foi fungicida para todos os dermatófitos, inclusive em relação aos isolados multirresistentes. Preparo das solução conforme item 4.1.3. (Preparo das soluções).

4.4.4.2. Isolados clínicos dermatofíticos selecionados para o estudo

Quatro dermatófitos multirresistentes, um de cada espécie - MCA 36*, MGY 58*, TME 34* e TRU 43*.

4.4.4.3. Técnica

Seguiu-se metodologia de NATESAN et al. (2008) e SIMONETTI et al. (2014), com modificações. Os inóculos dermatofíticos, preparados tal qual no item 4.4.1.4.1. (Preparo do inóculo fúngico), foram incubados a 30 °C (estufa DE LEO), em eppendorfs estéreis (2.0 mL; Sarstedt), com o SIM, em concentrações correspondentes a CIM, 2xCIM e 4xCIM, por 48 h. As concentrações do sal utilizadas para cada espécie dermatofítica foram as seguintes: para MCA 36* CIM = 1.56 µg/mL; 2xCIM = 3.13 µg/mL e 4xCIM = 6.25 µg/mL; para MGY 58* CIM = 3.13 µg/mL; 2xCIM = 6.25 µg/mL e 4xCIM = 12.50 µg/mL; para TME 34* CIM = 0.39 µg/mL; 2xCIM = 0.78 µg/mL e 4xCIM = 1.56 µg/mL e para TRU 43* CIM = 1.56

$\mu\text{g/mL}$; $2\times\text{CIM} = 3.13 \mu\text{g/mL}$ e $4\times\text{CIM} = 6.25 \mu\text{g/mL}$). No decorrer das 48 h de incubação, alíquotas (100 μL) das suspensões fúngicas tratadas *in vitro* com o SIM, foram coletadas dos eppendorfs, nos tempos 1 h, 6 h, 12 h, 24 h e no tempo final de 48 h. Realizaram-se diluições seriadas das alíquotas coletadas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}), as quais foram semeadas em placas de Petri com ABD, por *spread-plate* (espalhamento), com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 30 °C, por 96 h. Após o referido período de incubação, foi realizada a contagem do número de colônias dermatofíticas viáveis. O número de UFC. mL^{-1} foi determinado, comparando-se com o controle sem tratamento e levando-se em consideração o fator de diluição, optando-se pela avaliação na diluição 10^{-2} . As curvas de morte fúngica foram plotadas em função do \log_{10} UFC. mL^{-1} e do tempo. O ensaio foi realizado em triplicata, estimando-se os desvios padrões. O fundamento da técnica é determinar a cinética do composto-teste, avaliando-se a capacidade fungicida do mesmo em função do tempo.

4.5. Avaliação dos mecanismos de ação

4.5.1. SIMs selecionados para o estudo

$\text{C}_{16}\text{MImCl}$, $\text{C}_{16}\text{MImMeS}$, $\text{C}_{16}\text{MImNTf}_2$ - os três SIMs mais efetivos (com os menores valores de CIM contra todos os dermatófitos) e que apresentam o mesmo tamanho de cadeia lateral (16 carbonos), com diferentes ânions. Preparo das soluções conforme item 4.1.3. (Preparo das soluções).

4.5.2. Isolados clínicos dermatofíticos selecionados para o estudo

Todos os sete isolados dermatofíticos multirresistentes (MCA 36*, MCA 40*, MGY 58*, TME 16*, TME 34*, TRU 25*, TRU 43*).

4.5.3. Análise do efeito sobre a biossíntese do ergosterol (ensaio do ergosterol quantitativo)

4.5.3.1. Agente antifúngico selecionado para o estudo

Cetoconazol - a procedência, a pureza e o preparo da solução estão indicados no item 4.2. (Agentes antifúngicos e preparo das soluções). O CTZ foi o antifúngico controle escolhido, em função de que sabidamente age via biossíntese

do ergosterol fúngico, impedindo a completa formação do principal esterol da membrana celular fúngica (MOOSSAVI; BAGHERI; SCHER, 2001; ODSS; BROWN; GOW, 2003; HAMDAN; HAHN, 2006).

4.5.3.2. Técnica

Seguiu-se metodologia de BHOSLE et al. (2011), RAJPUT et al. (2013) e OUF et al. (2013), com adaptações. O inóculo preparado tal como no item 4.4.1.4.1. (Preparo do inóculo fúngico), porém em CSD, foi adicionado em eppendorfs estéreis (1.5 mL; Sarstedt), juntamente com os SIM's a serem avaliados e o CTZ (nas concentrações inibitórias mínimas e sub-inibitórias – CIM/2). Controles sem tratamento foram realizados com o inóculo das diferentes espécies multirresistentes sem adição de nenhuma substância. Os *eppendorfs* foram incubados por um período de 96 h a 30 °C. Posteriormente, realizou-se centrifugação (Eppendorf Centrifuge 5415R) das amostras a 2700 rpm por 5 min., descartou-se o sobrenadante e lavou-se o pélete com água purificada esterilizada cuidadosamente, por 3 vezes. Determinou-se o peso do precipitado (eppendorf com pélete de células dermatofíticas; balança analítica semi-micro-AND) e então se adicionou 1.3 mL de solução de KOH a 25% (25% KOH, 35% água millique estéril e volume completado para 100% com etanol - marca Nuclear), seguindo agitação em vórtex (agitador mini-vortex PV-1, Jimeno) por 1 minuto, para saponificação da membrana celular. As suspensões foram transferidas para mini-tubos estéreis de boro-silicato com tampa e colocadas em banho de água (Biomatic, modelo 869, por 1 h a 90 °C). Após resfriamento a temperatura ambiente, os esteróis foram extraídos com a adição de 1.0 mL de água millique estéril, 3.0 mL de hexano (Merk) e agitação em vórtex por 3 min. A mistura foi deixada em repouso por 72 h a -20 °C (Freezer Consul CVU20GB) para separação da camada hexânica. Realizou-se a leitura espectrofotométrica (Envision 2014 Multilabel Reader, PerkinElmer, USA) com uma solução 1:5 da camada hexânica em etanol. Fez-se a leitura da absorbância em 230 nm e 282 nm, em cubetas de quartzo de 1 cm. A presença do ergosterol e do seu último intermediário, o 24(28)-diidroergosterol (24(28)DHE), foi verificada pelas absorbâncias em diferentes comprimentos de onda. O esterol intermediário apresenta intenso espectro em 230 nm e o complexo ergosterol e 24(28)DHE tem uma absorção máxima a 282 nm. Desse modo, o conteúdo de ergosterol foi

calculado como percentagem em relação ao peso do precipitado (pélete), descontando-se a percentagem do seu intermediário, de acordo com as equações:

$$(a) \% \text{ ergosterol} + \% 24(28)\text{DHE} = [(Abs_{282}/290) \times F] / \text{peso do pélete}$$

$$(b) \% 24(28)\text{DHE} = [(Abs_{230}/518) \times F] / \text{peso do pélete}$$

$$\% \text{ ergosterol} = (a) - (b)$$

Onde,

F = fator de diluição em etanol

290 = valor ξ , em percentagem por cm, determinado para o ergosterol cristalino.

518 = valor ξ , em percentagem por cm, determinado para o 24(28)DHE cristalino.

O ensaio foi realizado em triplicata. O fundamento da técnica consiste em verificar se os compostos-teste agem em nível de interferência, prejudicando de alguma forma, a rota normal de biossíntese do ergosterol fúngico, reduzindo sua concentração citoplasmática.

4.5.3.3. Estatística

Aplicou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Mann-Whitney, considerando significância quando $p < 0.05$. As análises foram conduzidas em Statistica v 10.0 software estatístico (Statsoft, Tulsa).

4.5.4. Análise do efeito de complexação com ergosterol exógeno (ensaio do ergosterol qualitativo)

4.5.4.1. Agente antifúngico selecionado para o estudo

Anfotericina B, da classe dos polienos - a procedência, a pureza e o preparo da solução estão indicados no item 4.2. (Agentes antifúngicos e preparo das soluções). A AFB foi o antifúngico controle escolhido, em função de que sabidamente age via complexação com o ergosterol da membrana celular fúngica (GONÇALVES, 2011).

4.5.4.2. Técnica

Seguiu-se metodologia de MOREIRA et al. (2010) e CARRASCO et al. (2012). Nesse ensaio as determinações das CIM's dos SIMs e antifúngico selecionado foram conduzidas tal qual no item 4.4.1.4.2. (Determinação da CIM) e

4.4.1.4.1. (Preparo do inóculo fúngico), sem e com adição de ergosterol (Sigma-Aldrich) nas concentrações de 50.0 a 200.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O ergosterol comercial foi dissolvido em dimetilformamida (Sigma-Aldrich) e diluído no meio de cultura (meio RPMI 1640, contendo *L*-glutamina, sem bicarbonato de sódio, tamponado a pH 7.0 com MOPS 0.165 mol.L⁻¹; Sigma-Aldrich), de forma que a concentração final do solvente fosse de 0.1%. Incubou-se as microplacas até 168 h (7 dias) a 30 °C (estufa DE LEO). A CIM foi determinada visivelmente pela ausência ou presença de crescimento fúngico, comparado com o controle sem tratamento. Realizou-se uma leitura das placas em 4 dias e outra em 7 dias. O ensaio foi realizado em duplicata. O fundamento do teste consiste em detectar se um composto atua por ligação ao ergosterol da membrana dos fungos, fornecendo-se ergosterol exógeno às substâncias-teste, que se possuem afinidade por esteróis, formam rapidamente um complexo com o ergosterol comercial fornecido, evitando-se assim a complexação com o ergosterol próprio da membrana celular fúngica; como consequência, um aumento da CIM é observado para esses compostos (CARRASCO et al., 2012).

4.5.5. Análise do efeito sobre a parede celular fúngica (ensaio do sorbitol)

4.5.5.1. Agente antifúngico selecionado para o estudo

Anidulafungina, da classe das equinocandinas - a procedência, a pureza e o preparo da solução estão indicados no item 4.2. (Agentes antifúngicos e preparo das soluções). A ANF foi o antifúngico controle escolhido, em função de que sabidamente age inibindo de modo seletivo a enzima 1,3- β -D glucana sintase, impedindo a formação da 1,3- β -D glucana, um componente essencial da parede celular dos fungos, que tem importante função estrutural, conferindo rigidez e integridade à parede (ODSS; BROWN; GOW, 2003; MORRIS; VILLMANN, 2006).

4.5.5.2. Técnica

Seguiu-se metodologia de MOREIRA et al. (2010) e CARRASCO et al. (2012). As determinações das CIM's dos SIMs e antifúngico selecionado foram conduzidas tal qual no item 4.4.1.4.2. (Determinação da CIM) e 4.4.1.4.1. (Preparo do inóculo fúngico), sem e com adição de sorbitol (Sigma-Aldrich) na concentração de 0.8 M. O sorbitol comercial foi dissolvido no próprio meio de cultura (meio RPMI

1640, contendo *L*-glutamina, sem bicarbonato de sódio, tamponado a pH 7.0 com MOPS 0.165 mol.L⁻¹; Sigma-Aldrich). Incubou-se as microplacas até 168 h a 30 °C (estufa DE LEO). A CIM foi determinada visivelmente pela ausência ou presença de crescimento fúngico, comparado com o controle sem tratamento. Realizou-se uma leitura das placas em 4 dias e outra em 7 dias. Para a ANF, conforme a CLSI (M38-A2; 2008; p. 26 – Appendix A, MECs of Caspofungin and Anidulafungin), determinou-se a concentração efetiva mínima (CEM), que é a menor concentração do agente antifúngico que leva ao crescimento de formas hifais pequenas, arredondadas e compactas, comparadas com o controle sem tratamento. Essa terminologia é usada para as equinocandinas. O ensaio foi realizado em duplicata. Com esse procedimento, espera-se que a CIM de uma substância que age na parede aumente na presença de sorbitol, já que o mesmo realiza um processo de proteção osmótica da parede celular fúngica (FROST et al., 1995).

4.5.6. Análise do efeito de lise celular

4.5.6.1. Composto controle selecionado para o estudo

Dodecilsulfato de sódio (SDS) – tensoativo sabidamente eficaz no processo de lise celular (ESCALANTE et al., 2008). Foi preparada uma solução aquosa de SDS à 4% (HIMEDIA, Mod: MB010), em água ultrapura estéril.

4.5.6.2. Técnica

Seguiu-se metodologia de LUNDE e KUBO (2000) e ESCALANTE et al. (2008). Inóculos fúngicos dermatofíticos foram preparados tal qual no item 4.4.1.4.1. (Preparo do inóculo fúngico), porém em tampão MOPS, pH 6.0. Alíquotas dos inóculos foram adicionadas em *ependorfs* juntamente com os SIMs avaliados, em concentrações correspondentes a CIM, e a solução de SDS 4% (que na diluição 1:2 que ocorre com o inóculo torna-se 2%). Foram feitos também controles sem tratamento. Seguiu-se incubação por 48 h a 30 °C (estufa DE LEO). Dentre as 48 h de incubação, nos tempos 6 h, 12 h, 24 h e 48 h (final) as amostras foram centrifugadas a 2700 rpm por 5 min. (Eppendorf Centrifuge 5415R) e o sobrenadante foi coletado para análise da absorbância em 260 nm (B446 - Beckman DU 640 Spectrophotometer). O ensaio foi realizado em triplicata e o resultado expresso em percentagem de lise celular fúngica, considerando-se que o tensoativo

SDS ocasiona 100 % de lise. O fundamento da técnica consiste em verificar se as substâncias-teste possuem capacidade de ocasionar lise, tanto quanto o SDS.

4.5.6.3. Estatística

Aplicou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando significância quando $p < 0.05$. As análises foram conduzidas em Statistica v 10.0 software estatístico (Statsoft, Tulsa).

4.6. Avaliação da toxicidade

4.6.1. SIMs selecionados para o estudo, concentrações testadas e preparo das soluções

Selecionou-se $C_{16}MImCl$, $C_{16}MImMeS$, $C_{16}MImNTf_2$ - os três SIMs mais efetivos (com os menores valores de CIM contra todos os dermatófitos) e que apresentam o mesmo tamanho de cadeia lateral (16 carbonos), com diferentes ânions.

As concentrações dos SIMs avaliadas foram as correspondentes a média geométrica das concentrações mínimas que inibem 50% dos isolados fúngicos analisados (CIM_{50}), considerando-se as 4 espécies – *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*, e concentrações 10 e 100 vezes superiores. Desse modo, foram testadas as seguintes concentrações, relativas a cada sal: $C_{16}MImCl$ - 0.07 $\mu g/mL$ (CIM_{50}), 0.70 $\mu g/mL$ (10x CIM_{50}) e 7.00 $\mu g/mL$ (100x CIM_{50}); $C_{16}MImMeS$ - 0.05 $\mu g/mL$ (CIM_{50}), 0.50 $\mu g/mL$ (10x CIM_{50}) e 5.00 $\mu g/mL$ (100x CIM_{50}) e $C_{16}MImNTf_2$ - 2.21 $\mu g/mL$ (CIM_{50}), 22.10 $\mu g/mL$ (10x CIM_{50}) e 221.00 $\mu g/mL$ (100x CIM_{50}). Todos os SIMs foram dissolvidos e posteriormente diluídos em tampão fosfato salino (PBS; K9-7112-KASVI).

4.6.2. Cultura celular

O preparo da cultura celular foi realizado conforme MONTAGNER et al. (2010). As culturas celulares de leucócitos humanos foram preparadas utilizando-se sangue venoso, coletado por punção venosa, de um voluntário do sexo masculino (protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) - nº de autorização

23.081,005770/ 009-38). Alíquotas de 1.0 mL de sangue total foram imediatamente transferidas para 10.0 mL de meio RPMI 1640 (contendo L-glutamina, sem bicarbonato de sódio, tamponado a pH 7.0 com MOPS 0.165 mol.L⁻¹; Sigma-Aldrich), suplementado com 1% de fito-hemaglutinina, 10% de soro fetal bovino e 1% de estreptomicina/penicilina. Esse homogeneizado de sangue e meio de cultura com suplementação foi acondicionado em frascos de cultura de células (frascos TPP de 15.0 mL, Mod: 90025, Biosystems). Os frascos de cultura celular foram divididos em grupos (cada grupo em triplicata), para o tratamento, de tal modo: 3 frascos de cultura celular (9.0 mL) com 1.0 mL de PBS (controle negativo); 3 frascos de cultura celular (9.0 mL) com 1.0 mL de solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 100 µM, que é sabidamente tóxico para as células (controle positivo); 3 frascos de cultura celular (9.0 mL) com 1.0 mL de C₁₆MImCl 0.07 µg/mL (CIM₅₀); 3 frascos de cultura celular (9.0 mL) com 1.0 mL de C₁₆MImCl 0.70 µg/mL (10xCIM₅₀); 3 frascos de cultura celular (9.0 mL) com 1.0 mL de C₁₆MImCl 7.00 µg/mL (100xCIM₅₀); 3 frascos de cultura celular (9.0 mL) com 1.0 mL de C₁₆MImMeS 0.05 µg/mL (CIM₅₀); 3 frascos de cultura celular (9.0 mL) com 1.0 mL de C₁₆MImMeS 0.50 µg/mL (10xCIM₅₀); 3 frascos de cultura celular (9.0 mL) com 1.0 mL de C₁₆MImMeS 5.00 µg/mL (100xCIM₅₀); 3 frascos de cultura celular (9.0 mL) com 1.0 mL de C₁₆MImNTf₂ 2.21 µg/mL (CIM₅₀); 3 frascos de cultura celular (9.0 mL) com 1.0 mL de C₁₆MImNTf₂ 22.10 µg/mL (10xCIM₅₀) e 3 frascos de cultura celular (9.0 mL) com 1.0 mL de C₁₆MImNTf₂ 221.00 µg/mL (100xCIM₅₀).

Subsequente à adição em cada frasco do tratamento supracitado com cuidadosa homogeneização, as culturas de células foram incubadas (incubadora de CO₂ para cultura celular, 5% de CO₂, Modelo MCO-19AIC, Sanyo) por 72 h a 37 °C. Após esse período, foram estabelecidos os parâmetros citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos nos posteriores testes, a seguir descritos.

4.6.3. Avaliação da citotoxicidade (efeito sobre a proliferação e viabilidade celular)

4.6.3.1. Técnica

Seguiu-se metodologia de BUROW et al. (1998). Para análise do efeito dos SIMs sobre a proliferação celular, 10 µL de cada suspensão celular (pós-tratamento

e incubação de 72 h) foi homogeneizada com 90 µL de solução de Turk (solução aquosa de ácido acético 3% e violeta de genciana 1%, Renylab) em criotubos (TruCool™). Uma alíquota (10 µL) do homogeneizado foi colocada em câmara de Neubauer (ATC-110010 - improved- L.Optik) para contagem de número de leucócitos, em microscópio Olympus® (modelo CH-30, Japão; × 400 de ampliação). O resultado foi expresso em número de leucócitos por mm³ e comparado com o controle positivo (H₂O₂ 100 µM) e negativo - PBS (diluyente). O ensaio foi realizado em triplicata.

Para análise do efeito dos SIMs sobre a viabilidade celular, 100 µL de cada suspensão celular (pós-tratamento e incubação de 72 h) foi homogeneizada com 100 µL de azul de tripan 0.2% (Sigma-Aldrich) em criotubos (TruCool™). Uma alíquota (10 µL) do homogeneizado foi colocada em câmara de Neubauer (ATC-110010 - improved- L.Optik) para análise dos leucócitos, em microscópio Olympus® (modelo CH-30, Japão; × 400 de ampliação), observando-se dois tipos de células: (a) células vivas e integras (viáveis), que apareceram incolores ou coradas de azul bem claro e (b) células mortas, com uma cor azul intensa. O resultado foi expresso em percentagem de células viáveis e comparado com o controle positivo (H₂O₂ 100 µM) e negativo - PBS (diluyente). O ensaio foi realizado em triplicata.

4.6.3.2. Estatística

Efetou-se análise de variância (ANOVA), seguida por teste de Bonferroni, considerando significância quando $p < 0.05$. As análises foram conduzidas no software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA - versão 5.02 para Windows).

4.6.4. Avaliação da mutagenicidade (análise da frequência de micronúcleos (MN))

4.6.4.1. Técnica

Seguiu-se metodologia de SCHMID (1975) e THOMAS et al. (2008). O volume de 20 µL de cada suspensão celular (pós-tratamento e incubação de 72 h) foi fixado em lâminas (esfregaço), as quais foram secas à temperatura ambiente, coradas por Panótico Rápido® (Laborclin) e, posteriormente, analisadas em

microscópio Olympus® (modelo CH-30, Japão). Contou-se 100 células por lâmina, sendo que todas as partículas no interior das células separadas do núcleo, não excedendo 1/3 do tamanho real do mesmo e com bordas bem visíveis foram contabilizadas como MN. Os resultados foram expressos em percentagem de frequência de MN e comparados com o controle positivo (H₂O₂ 100 µM) e negativo - PBS (diluyente). O ensaio foi realizado em triplicata.

4.6.4.2. Estatística

Efetuiu-se análise de variância (ANOVA), seguida por teste de Bonferroni, considerando significância quando $p < 0.05$. As análises foram conduzidas no software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA - versão 5.02 para Windows).

4.6.5. Avaliação da genotoxicidade (ensaio cometa alcalino)

4.6.5.1. Técnica

Seguiu-se metodologia de SINGH et al. (1988) e todo o procedimento, desde a preparação da suspensão celular até análise final, foi executado sob lâmpada de cor vermelha, de baixa intensidade luminosa, para evitar-se qualquer dano adicional no DNA. O volume de 10 µL de cada suspensão celular (pós-tratamento e incubação de 72 h) foi homogeneizado com 90 µL de agarose de baixo ponto de fusão. Esse homogeneizado foi imediatamente adicionado em lâminas de microscopia (Prolab) pré-revestidas com agarose de ponto de fusão normal. As lâminas foram mantidas sob-refrigeração até que o conteúdo solidificasse totalmente (cerca de 5 min.). Posteriormente, para o processo de lise, as lâminas foram imersas em tampão de lise (constituído de 89.0 mL de solução de lise, 10.0 mL de DMSO e 1.0 mL de Triton; Prolab) por 1 h. Subsequente, para o processo de desenovelamento, retiraram-se as lâminas da solução de lise, uma a uma, removendo-se o excesso de solução e levando-as, imediatamente, para cuba de eletroforese, que estava sob condições controladas de temperatura (banho de gelo, 4 °C). Adicionou-se tampão de eletroforese e procedeu-se o processo por 20 min., a 25 V e 300 mA, em uma câmara horizontal (Fisher Scientific, Cód. FB-SB-2025), para separar fragmentos de DNA intactos de possíveis fragmentos danificados. Para neutralização retirou-se as lâminas da cuba de eletroforese e adicionou-se sobre as mesmas tampão de

neutralização Tris 0.4 M (pH 7.5; Prolab). Repetiu-se o processo de lavagem com o tampão por mais 2 vezes, finalizando as lavagens com água destilada. Secaram-se as lâminas por 2 h a 37 °C (estufa de cultura ECB). Para fixação colocou-se as lâminas em uma cubeta e adicionou-se sobre as mesmas 100 mL de solução fixadora (15% de ácido tricloroacético, 5% de sulfato de zinco heptahidratado e 5% de glicerol em água destilada), e deixou-as em repouso por 10 minutos. Lavou-se 3 vezes com água destilada e secou-se as lâminas por 2 h a 37 °C (estufa de cultura ECB). Por fim, para coloração hidratou-se as lâminas com água destilada, por 5 min., e corou-se por aproximadamente 30 min. com solução de prata (66 mL de solução aquosa de carbonato de sódio 5% e 34 mL de (nitrato de amônia 0.1%, nitrato de prata 0.1%, ácido tungstosilícico 0.25% e formaldeído 0.15%)) a 37 °C (até as lâminas começarem a escurecer). Lavou-se 3 vezes com água destilada. As lâminas foram deixadas, por 5 min., em solução *stop* (solução aquosa de ácido acético 1%). Lavou-se 3 vezes com água destilada e secou-se as lâminas à temperatura ambiente. Analisou-se microscopicamente (microscópio Olympus®, modelo CH-30, Japão, x 400 de ampliação), observando-se 100 células por lâmina. Classificou-se as células de acordo com o formato celular, em quatro classes de dano, variando de 0 (sem dano visível) a 4 (dano máximo). A soma desses valores forneceu um índice de dano (ID) único para cada tratamento. Tal índice pode oscilar entre 0 (100 células X 0) a 400 (100 X 4). O ensaio foi realizado em triplicata.

O fundamento da técnica é que em condições eletroforéticas alcalinas e pós-tratamento específico das amostras, o DNA danificado (contendo quebras e clivagens) migrará mais do que o DNA intacto e produzirá uma "cauda de cometa", visualizada pela coloração com prata. O cometa é um dos testes de genotoxicidade mais promissores, precisos e sensíveis para análise de danos ao DNA em células individuais (MUKHOPADHYAY et al., 2004; COLLINS, 2009).

4.6.5.2. Estatística

Efetou-se análise de variância (ANOVA), seguida por teste de Bonferroni, considerando significância quando $p < 0.05$. As análises foram conduzidas no software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA - versão 5.02 para Windows).

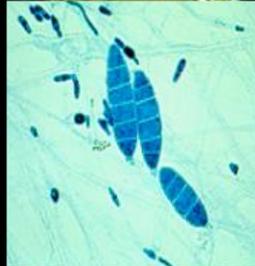
4.6.6. Avaliação do efeito sobre a estabilidade cromossômica

4.6.6.1. Técnica

Seguiu-se metodologia de YUNIS (1976). Solução de colcemide (10.00 µg/mL, 50 µL) foi adicionada à 7.0 mL da suspensão celular (pós-tratamento e incubação de 72 h), com homogeneização suave. As amostras foram incubadas durante 60 min. a 37 °C (estufa de cultura ECB) e posteriormente foram centrifugadas (1.800 rpm, 10 min). O sobrenadante foi descartado e o pélete ressuspense em solução hipotônica de KCl 0.075 M (Merk), seguido de incubação por 16 min. a 37 °C (estufa de cultura ECB). Solução fixadora (metanol – ácido acético (3:1), 250 µL, Merk) foi adicionada a cada tubo, seguido por centrifugação (1.800 rpm, 10 min.). Essa fase foi repetida três vezes e, no final, as células foram ressuspensas novamente em solução fixadora para análise. Uma alíquota desta suspensão, ligeiramente opalescente, foi adicionada em lâminas, as quais foram secas à temperatura ambiente. As células foram examinadas com aumento de 10x (modelo Olympus® CH-30, Japão) para análise da distribuição, do número e densidade de cromossomos na metáfase (material genético condensado). O ensaio foi realizado em triplicata e o resultado expresso em percentagem de anormalidades cromossômicas numéricas, comparado com o controle positivo (H₂O₂ 100 µM) e negativo - PBS (diluyente).

4.6.6.2. Estatística

Efetou-se análise de variância (ANOVA), seguida por teste de Bonferroni, considerando significância quando $p < 0.05$. As análises foram conduzidas no software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA - versão 5.02 para Windows).



RESULTADOS E DISCUSSÃO

This block contains a collage of scientific images. On the left, there are two molecular models showing electron density maps (green and red mesh) over a ball-and-stick model of a molecule. In the center, there is a chemical structure of a five-membered ring with a nitrogen atom and a positive charge, with the letters 'N', 'Z', and 'I' positioned around it. To the right of the structure is a ball-and-stick model of a molecule with blue and grey atoms. On the far right, there is a photograph of a laboratory setup featuring a yellow liquid in a beaker and a multi-channel pipette.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação do potencial antidermatofítico

5.1.1. Análise da suscetibilidade

Todos os 11 SIMs (C_4MImCl , $C_4MImMeS$, $C_4MImOcS$, $C_9MImMeS$, $C_{10}MImCl$, $(C_{10})_2MImCl$, $C_{16}MImCl$, $C_{16}MImMeS$, $C_{16}MImNTf_2$, $C_{16}MImSaC$ e $C_{18}MImCl$) avaliados no *screening* foram capazes de inibir o crescimento dos dermatófitos *in vitro*, na concentração de 500 $\mu g/mL$. A intenção do *screening* era selecionar os SIMs que apresentassem atividade antidermatofítica, para dar continuidade aos ensaios de suscetibilidade, com determinação da CIM e CFM. Como todos os compostos químicos foram efetivos em impedir o desenvolvimento fúngico, em alta concentração, deu-se seguimento aos demais testes de suscetibilidade com a série completa de 11 SIMs.

Em relação à determinação da CIM, os valores obtidos para os 11 SIMs e antifúngicos comerciais avaliados, para as espécies *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*, são apresentados nas tabelas 2, 3, 4 e 5, respectivamente. De modo geral, pôde-se observar para *M. canis* que a faixa de CIM dos SIMs, em relação a todos os isolados da espécie variou de 0.05 $\mu g/mL$ – 50.00 $\mu g/mL$; para *M. gypseum* e *T. mentagrophytes* foi de 0.02 – 50.00 $\mu g/mL$ e para *T. rubrum* 0.05 – 25.00 $\mu g/mL$. Os antifúngicos TBF, GSF e CTZ, utilizados como substâncias padrão para comparações de potencial antifúngico, apresentaram valores de CIM dentro do esperado (CLSI M38-A2, 2008), para todas as espécies, com exceção dos isolados multirresistentes. Com base nos limites que definiram os casos de resistência, já estabelecidos na metodologia (TBF: CIM \geq 1.00 $\mu g/mL$, GSF: CIM \geq 4.00 $\mu g/mL$ e CTZ: CIM \geq 8.00 $\mu g/mL$), os dermatófitos com suscetibilidade reduzida exibiram CIM's consideravelmente mais elevadas que as espécies sensíveis, sendo MCA 36*, MCA 40*, MGY 58*, TME 16*, TME 34* e TRU 25* considerados resistentes aos 3 antifúngicos analisados e TRU 43* resistente à GSF e CTZ, configurando-se dessa forma, todos os sete, como isolados multirresistentes (resistência múltipla a no mínimo dois antifúngicos de classes diferentes).

Tabela 2. Suscetibilidade dos isolados de *M. canis* (MCA) em relação ao tratamento *in vitro* com 11 SIMs e 3 antifúngicos comerciais (terbinafina – TBF, griseofulvina – GSF e cetoconazol – CTZ).

Dermatófitos (n=9)	CIM Sais imidazólicos**							
	C ₄ MImCl	C ₄ MImMeS	C ₄ MImOcS	C ₉ MImMeS	C ₁₀ MImCl	(C ₁₀) ₂ MImCl		
MCA 01	12.50/71.56	12.50/53.35	12.50/37.59	6.25/20.66	1.56/6.04	3.13/7.84		
MCA 29	12.50/71.56	3.13/13.34	12.50/37.59	6.25/20.66	1.56/6.04	1.56/3.92		
MCA 32	50.00/286.25	12.50/53.35	50.00/150.38	12.50/41.33	1.56/6.04	3.13/7.84		
MCA 33	50.00/286.25	12.50/53.35	12.50/37.59	12.50/41.33	3.13/12.07	1.56/3.92		
MCA 36*	50.00/286.25	12.50/53.35	12.50/37.59	12.50/41.33	3.13/12.07	12.50/31.32		
MCA W3	6.25/35.78	6.25/26.67	0.39/1.17	6.25/20.66	1.56/6.04	3.13/7.84		
MCA 38	12.50/71.56	12.50/53.35	0.39/1.17	3.13/10.33	3.13/12.07	3.13/7.84		
MCA 39	12.50/71.56	12.50/53.35	12.50/37.59	12.50/41.33	1.56/6.04	0.78/1.96		
MCA40*	25.00/143.13	12.50/53.35	50.00/150.38	12.50/41.33	1.56/6.04	12.50/31.32		
CIM ₅₀	12.50/71.56	12.50/53.35	12.50/37.59	12.50/41.33	1.56/6.04	3.13/7.84		
Faixa de CIM (µg/mL)	6.25–50.00	3.13–12.50	0.39–50.00	3.13–12.50	1.56–3.13	0.78/12.50		
Dermatófitos (n=9)	CIM Sais imidazólicos**					CIM Antifúngicos***		
	C ₁₆ MImCl	C ₁₆ MImMeS	C ₁₆ MImNTf ₂	C ₁₆ MImSaC	C ₁₈ MImCl	TBF	GSF	CTZ
MCA 01	0.39/1.14	0.39/0.97	1.56/2.66	3.13/7.03	12.50/33.69	0.03	1.00	0.50
MCA 29	0.05/0.14	0.05/0.12	0.39/0.66	3.13/7.03	6.25/16.84	0.13	0.50	0.06
MCA 32	0.05/0.14	0.05/0.12	0.20/0.33	1.56/3.51	6.25/16.84	0.13	0.50	0.13
MCA 33	0.05/0.14	1.56/3.88	0.05/0.08	1.56/3.51	6.25/16.84	---	---	0.06
MCA 36*	3.13/9.11	1.56/3.88	6.25/10.63	12.50/28.11	12.50/33.69	1.00	>32.00	8.00
MCA W3	0.39/1.14	0.05/0.12	0.10/0.17	0.78/1.76	6.25/16.84	0.06	0.25	0.50
MCA 38	0.05/0.14	0.20/0.49	1.56/2.66	3.13/7.03	12.50/33.69	0.03	0.50	0.50
MCA 39	0.20/0.57	0.05/0.12	1.56/2.66	3.13/7.03	6.25/16.84	0.03	0.25	0.50
MCA40*	0.05/0.14	0.05/0.12	1.56/2.66	12.50/28.11	12.50/33.69	1.00	>32.00	8.00
CIM ₅₀	0.05/0.14	0.05/0.12	1.56/2.66	3.13/7.03	6.25/16.84	0.03	0.50	0.50
Faixa de CIM (µg/mL)	0.05–3.13	0.05–1.56	0.05–6.25	0.78–12.50	6.25–12.50	0.03 – 1.00	0.25 – >32.00	0.06 – 8.00

*Isolados multirresistentes. **Valores de CIM e CIM₅₀ dos SIMs expressos em µg/mL/nmol/mL. ***CIM e CIM₅₀ dos antifúngicos em µg/mL. A letra “n” representa o número de isolados fúngicos analisados.

Tabela 3. Suscetibilidade dos isolados de *M. gypseum* (MGY) em relação ao tratamento *in vitro* com 11 SIMs e 3 antifúngicos comerciais (terbinafina – TBF, griseofulvina – GSF e cetoconazol – CTZ).

Dermatófitos (n=12)	CIM Sais imidazólicos**							
	C ₄ MImCl	C ₄ MImMeS	C ₄ MImOcS	C ₉ MImMeS	C ₁₀ MImCl	(C ₁₀) ₂ MImCl		
MGY 42	50.00/286.25	25.00/106.70	12.50/37.59	3.13/10.33	0.20/0.75	6.25/15.66		
MGY 45	50.00/286.25	25.00/106.70	50.00/150.38	6.25/20.66	0.39/1.51	3.13/7.84		
MGY 46	12.50/71.56	12.50/53.35	25.00/75.19	6.25/20.66	0.78/3.02	3.13/7.84		
MGY 48	12.50/71.56	12.50/53.35	50.00/150.38	6.25/20.66	0.78/3.02	0.78/1.96		
MGY 49	12.50/71.56	12.50/53.35	12.50/37.59	6.25/20.66	0.39/1.51	3.13/7.84		
MGY 50	12.50/71.56	12.50/53.35	12.50/37.59	3.13/10.33	0.39/1.51	3.13/7.84		
MGY 51	12.50/71.56	12.50/53.35	50.00/150.38	6.25/20.66	3.13/12.07	3.13/7.84		
MGY 52	12.50/71.56	12.50/53.35	12.50/37.59	3.13/10.33	0.78/3.02	1.56/3.92		
MGY 53	50.00/286.25	25.00/106.70	50.00/150.38	3.13/10.33	0.39/1.51	3.13/7.84		
MGY 54	50.00/286.25	25.00/106.70	12.50/37.59	6.25/20.66	0.39/1.51	1.56/3.92		
MGY 57	12.50/71.56	12.50/53.35	25.00/75.19	6.25/20.66	0.39/1.51	3.13/7.84		
MGY 58*	12.50/71.56	12.50/53.35	12.50/37.59	6.25/20.66	0.39/1.51	12.50/31.32		
CIM ₅₀	12.50/71.56	12.50/53.35	12.50/37.59	6.25/20.66	0.39/1.51	3.13/7.84		
Faixa de CIM (µg/mL)	12.50–50.00	12.50–25.00	12.50–50.00	3.13–6.25	0.20–3.12	0.78–12.50		
Dermatófitos (n=12)	CIM Sais imidazólicos**					CIM Antifúngicos***		
	C ₁₆ MImCl	C ₁₆ MImMeS	C ₁₆ MImNTf ₂	C ₁₆ MImSaC	C ₁₈ MImCl	TBF	GSF	CTZ
MGY 42	0.39/1.14	0.05/0.12	1.56/2.66	12.50/28.11	25.00/67.38	0.03	1.00	1.00
MGY 45	0.39/1.14	0.39/0.97	1.56/2.66	0.78/1.76	25.00/67.38	0.03	1.00	0.50
MGY 46	0.39/1.14	0.78/1.94	1.56/2.66	12.50/28.11	6.25/16.84	0.03	1.00	1.00
MGY 48	3.13/9.11	1.56/15.53	12.50/21.27	1.56/3.51	6.25/16.84	0.13	2.00	1.00
MGY 49	0.10/0.28	0.05/0.12	1.56/2.66	12.50/28.11	6.25/16.84	0.03	1.00	1.00
MGY 50	3.13/9.11	0.05/0.12	1.56/2.66	12.50/28.11	6.25/16.84	0.13	2.00	1.00
MGY 51	0.39/1.14	0.05/0.12	1.56/2.66	12.50/28.11	6.25/16.84	0.25	2.00	1.00
MGY 52	0.39/1.14	1.56/3.88	6.25/10.63	12.50/28.11	6.25/16.84	0.13	1.00	0.50
MGY 53	0.39/1.14	0.05/0.12	3.13/5.32	1.56/3.51	6.25/16.84	0.06	2.00	1.00
MGY 54	0.39/1.14	0.05/0.12	3.13/5.32	1.56/3.51	6.25/16.84	0.06	1.00	0.06
MGY 57	0.02/0.07	0.05/0.12	0.78/1.33	12.50/28.11	12.50/33.69	0.03	1.00	1.00
MGY 58*	6.25/18.22	3.13/7.77	12.50/21.27	3.13/7.03	12.50/33.69	2.00	>32.00	16.00
CIM ₅₀	0.39/1.14	0.05/0.12	1.56/2.66	12.50/28.11	6.25/16.84	0.03	1.00	1.00
Faixa de CIM (µg/mL)	0.02–6.25	0.05–3.13	0.78–12.50	0.78–12.50	6.25–25.00	0.03 – 2.00	1.00 – >32.00	0.06 – 16.00

*Isolados multirresistentes. **Valores de CIM e CIM₅₀ dos SIMs expressos em µg/mL/nmol/mL. ***CIM e CIM₅₀ dos antifúngicos em µg/mL. A letra “n” representa o número de isolados fúngicos analisados.

Tabela 4. Suscetibilidade dos isolados de *T. mentagrophytes* (TME) em relação ao tratamento *in vitro* com 11 SIMs e 3 antifúngicos comerciais (terbinafina – TBF, griseofulvina – GSF e cetoconazol – CTZ).

Dermatófitos (n=12)	CIM Sais imidazólicos**					
	C ₄ MImCl	C ₄ MImMeS	C ₄ MImOcS	C ₉ MImMeS	C ₁₀ MImCl	(C ₁₀) ₂ MImCl
TME 16*	12.50/71.56	12.50/53.35	50.00/150.38	3.13/10.33	12.50/48.29	12.50/31.32
TME 18	6.25/35.78	6.25/26.67	1.56/4.70	0.05/0.16	0.05/0.19	0.20/0.49
TME 31	12.50/71.56	12.50/53.35	6.25/18.80	3.13/10.33	0.05/0.19	0.78/1.96
TME 32	12.50/71.56	12.50/53.35	50.00/150.38	3.13/10.33	0.20/0.75	3.13/7.84
TME 33	50.00/286.25	25.00/106.70	0.02/0.07	6.25/20.66	0.39/1.51	3.13/7.84
TME 34*	12.50/71.56	12.50/53.35	25.00/75.19	3.13/10.33	12.50/48.29	12.50/31.32
TME 35	12.50/71.56	12.50/53.35	25.00/75.19	3.13/10.33	12.50/48.29	3.13/7.84
TME 36	3.13/17.89	6.25/26.67	50.00/150.38	0.05/0.16	0.10/0.38	0.05/0.12
TME 38	12.50/71.56	12.50/53.35	25.00/75.19	3.13/10.33	12.50/48.29	0.05/0.12
TME 40	12.50/71.56	12.50/53.35	25.00/75.19	0.05/0.16	12.50/48.29	3.13/7.84
TME 44	12.50/71.56	25.00/106.70	25.00/75.19	3.13/10.33	12.50/48.29	3.13/7.84
TME 46	12.50/71.56	12.50/53.35	12.50/37.59	0.05/0.16	0.20/0.75	0.78/1.96
CIM ₅₀	12.50/71.56	12.50/53.35	25.00/75.19	3.13/10.33	12.50/48.29	3.13/7.84
Faixa de CIM (µg/mL)	3.13–50.00	6.25–25.00	0.02–50.00	0.05–6.25	0.05–12.50	0.05–12.50

Dermatófitos (n=12)	CIM Sais imidazólicos**					CIM Antifúngicos***		
	C ₁₆ MImCl	C ₁₆ MImMeS	C ₁₆ MImNTf ₂	C ₁₆ MImSaC	C ₁₈ MImCl	TBF	GSF	CTZ
TME 16*	1.56/4.56	0.78/1.94	3.13/5.32	12.50/28.11	6.25/16.84	4.00	>32.00	16.00
TME 18	0.02/0.07	0.05/0.12	3.13/5.32	1.56/3.51	6.25/16.84	0.06	2.00	2.00
TME 31	3.13/9.11	3.13/7.77	3.13/5.32	6.25/14.06	12.50/33.69	0.03	0.50	4.00
TME 32	0.02/0.07	0.10/0.24	0.10/0.17	6.25/14.06	6.25/16.84	0.06	1.00	0.13
TME 33	0.02/0.07	0.02/0.06	1.56/2.66	6.25/14.06	25.00/67.38	0.03	0.50	2.00
TME 34*	12.50/36.44	0.39/0.97	12.50/21.27	12.50/28.11	12.50/33.69	4.00	>32.00	16.00
TME 35	3.13/9.11	0.05/0.12	3.13/5.32	6.25/14.06	12.50/33.69	---	---	2.00
TME 36	0.05/0.14	0.10/0.24	0.39/0.66	0.20/0.44	6.25/16.84	---	---	0.25
TME 38	1.56/4.56	0.05/0.12	3.13/5.32	1.56/3.51	6.25/16.84	0.03	2.00	2.00
TME 40	0.02/0.07	0.05/0.12	0.05/0.08	6.25/14.06	6.25/16.84	0.03	0.50	0.13
TME 44	0.02/0.07	0.05/0.12	3.13/5.32	0.78/1.76	6.25/16.84	0.03	0.50	2.00
TME 46	0.02/0.07	0.39/0.97	12.50/21.27	6.25/14.06	6.25/16.84	0.13	0.50	1.00
CIM ₅₀	0.02/0.07	0.05/0.12	3.13/5.32	6.25/14.06	6.25/16.84	0.03	0.50	2.00
Faixa de CIM (µg/mL)	0.02–12.50	0.02–3.13	0.05–12.50	0.20–12.50	6.25–25.00	0.03 – 4.00	0.50 – >32.00	0.13 – 16.00

*Isolados multirresistentes. **Valores de CIM e CIM₅₀ dos SIMs expressos em µg/mL/nmol/mL. ***CIM e CIM₅₀ dos antifúngicos em µg/mL. A letra “n” representa o número de isolados fúngicos analisados.

Tabela 5. Suscetibilidade dos isolados de *T. rubrum* (TRU) em relação ao tratamento *in vitro* com 11 SIMs e 3 antifúngicos comerciais (terbinafina – TBF, griseofulvina – GSF e cetoconazol – CTZ).

Dermatófitos (n=12)	CIM Sais imidazólicos**					
	C ₄ MImCl	C ₄ MImMeS	C ₄ MImOcS	C ₉ MImMeS	C ₁₀ MImCl	(C ₁₀) ₂ MImCl
TRU 20	12.50/71.56	12.50/53.35	12.50/37.59	3.13/10.33	1.56/6.04	1.56/3.92
TRU 23	12.50/71.56	12.50/53.35	25.00/75.19	3.13/10.33	6.25/24.15	1.56/3.92
TRU 25*	6.25/35.78	12.50/53.35	25.00/75.19	3.13/10.33	0.39/1.51	12.50/31.32
TRU 40	12.50/71.56	12.50/53.35	12.50/37.59	3.13/10.33	6.25/24.15	1.56/3.92
TRU 42	12.50/71.56	12.50/53.35	3.13/9.40	0.39/1.29	6.25/24.15	0.78/1.96
TRU 43*	12.50/71.56	12.50/53.35	12.50/37.59	1.56/5.17	0.39/1.51	1.56/3.92
TRU 46	12.50/71.56	12.50/53.35	12.50/37.59	3.13/10.33	6.25/24.15	1.56/3.92
TRU 48	12.50/71.56	12.50/53.35	25.00/75.19	3.13/10.33	6.25/24.15	1.56/3.92
TRU 49	6.25/35.78	6.25/26.27	12.50/37.59	3.13/10.33	0.20/0.75	1.56/3.92
TRU 50	0.20/1.12	12.50/53.35	6.25/18.80	0.39/1.29	0.20/0.75	0.39/0.98
TRU 52	12.50/71.56	12.50/53.35	6.25/18.80	3.13/10.33	6.25/24.15	1.56/3.92
TRU 53	1.56/8.95	12.50/53.35	6.25/18.80	3.13/10.33	0.05/0.19	12.50/31.32
CIM ₅₀	12.50/71.56	12.50/53.35	12.50/37.59	3.13/10.33	6.25/24.15	1.56/3.92
Faixa de CIM (µg/mL)	0.20–12.50	6.25–12.50	3.13–25.00	0.39–3.13	0.05–6.25	0.39–12.50

Dermatófitos (n=12)	CIM Sais imidazólicos**					CIM Antifúngicos***		
	C ₁₆ MImCl	C ₁₆ MImMeS	C ₁₆ MImNTf ₂	C ₁₆ MImSaC	C ₁₈ MImCl	TBF	GSF	CTZ
TRU 20	0.05/0.14	0.05/0.12	3.13/5.32	1.56/3.51	12.50/33.69	0.06	1.00	1.00
TRU 23	0.05/0.14	0.05/0.12	3.13/5.32	1.56/3.51	6.25/16.84	0.03	1.00	1.00
TRU 25*	12.50/36.44	1.56/3.88	12.50/21.27	12.50/28.11	6.25/16.84	1.00	>32.00	16.00
TRU 40	0.05/0.14	0.05/0.12	3.13/5.32	1.56/3.51	6.25/16.84	0.06	1.00	1.00
TRU 42	0.05/0.14	0.02/0.06	3.13/5.32	3.13/7.03	6.25/16.84	0.03	2.00	0.06
TRU 43*	12.50/36.44	1.56/3.88	12.50/21.27	1.56/3.51	12.50/33.69	0.03	4.00	16.00
TRU 46	0.05/0.14	0.05/0.12	3.13/5.32	3.13/7.03	12.50/33.69	0.03	2.00	1.00
TRU 48	0.05/0.14	0.05/0.12	3.13/5.32	3.13/7.03	12.50/33.69	0.03	2.00	1.00
TRU 49	0.39/1.14	0.10/0.24	3.13/5.32	1.56/3.51	6.25/16.84	0.03	1.00	0.06
TRU 50	0.05/0.14	0.05/0.12	3.13/5.32	1.56/3.51	12.50/33.69	0.06	1.00	1.00
TRU 52	0.39/1.14	0.05/0.12	3.13/5.32	0.78/1,76	12.50/33.69	0.03	2.00	1.00
TRU 53	0.05/0.14	0.05/0.12	0.05/0.08	1.56/3.51	12.50/33.69	---	---	1.00
CIM ₅₀	0.05/0.14	0.05/0.12	3.13/5.32	1.56/3.51	12.50/33.69	0.03	1.00	1.00
Faixa de CIM (µg/mL)	0.05–12.50	0.02–1.56	0.05–12.50	0.78–12.50	6.25–12.50	0.03 – 1.00 – 0.06 – 1.00	>32.00	16.00

*Isolados multirresistentes. **Valores de CIM e CIM₅₀ dos SIMs expressos em µg/mL/nmol/mL. ***CIM e CIM₅₀ dos antifúngicos em µg/mL. A letra “n” representa o número de isolados fúngicos analisados.

Como já mencionado todas as espécies dermatofíticas apresentaram sensibilidade aos SIMs testados, sendo que a diferença está no fato de que alguns compostos ocasionaram inibição fúngica em concentrações eminentemente baixas (por exemplo, 0.02 e 0.05 µg/mL) e outros em concentrações um pouco mais elevadas (25.00 e 50.00 µg/mL). Faixas de CIM, em µg/mL, com valores mais proeminentes foram observadas para *M. canis* com os SIMs C₄MImCl e C₄MImOcS (Tab. 2); para *M. gypseum* com C₄MImCl, C₄MImMeS, C₄MImOcS e C₁₈MImCl (Tab. 3); para *T. mentagrophytes* com C₄MImCl, C₄MImMeS, C₄MImOcS e C₁₈MImCl (Tab. 4) e para *T. rubrum* com C₄MImOcS (Tab. 5). As CIM's mais altas em nmol/mL seguiram a mesma tendência das CIM's mais acentuadas em µg/mL, ou seja, os SIMs com os maiores valores de CIM em µg/mL são também os que apresentaram os mais altos valores de CIM em nmol/mL.

Com base no supracitado e relacionando-se a estrutura das moléculas com o potencial antidermatofítico, observa-se que os compostos com menor tamanho de cadeia lateral (4 carbonos), para todas as espécies, e maior tamanho (18 carbonos), para algumas espécies, foram os menos efetivos *in vitro* em termos de concentração-efeito antidermatofítico. Dessa forma, constata-se que a extensão da cadeia alquílica desempenha uma função importante na inibição dos dermatófitos, regulando e/ou direcionando, de alguma forma, a interação das moléculas com as células fúngicas. Sugere-se como uma das razões prováveis para isso, que a redução do número de grupamentos metila em uma cadeia diminua a lipossolubilidade molecular, dificultando uma possível interação e/ou entrada nas barreiras membranosas celulares (LEHNINGER; NELSON; COX, 2014), porém quando há um aumento demasiado pode ocorrer a formação de micelas (LEHNINGER; NELSON; COX, 2014), pela proximidade entre as parcelas apolares de um composto, no caso de cadeias alquílicas grandes, já que os SIMs possuem propriedades surfactantes. Alguns estudos indicam que sais imidazólicos com comprimento de cadeia longo são comparáveis aos surfactantes iônicos tradicionais, em termos de capacidade de micelização em solução aquosa (DONG et al., 2008; JUNGNICHEL et al., 2008). Relata-se que quanto mais longa é a cadeia de hidrocarbonetos dos SIMs, tal como para os tensoativos convencionais, menor é a concentração micelar crítica, diretamente relacionada à porção catiônica dos compostos (JUNGNICHEL et al., 2008).

A investigação da atividade antimicrobiana, verificada em outros trabalhos, de alguns SIMs semelhantes à série dos sais pesquisados nesse estudo, corrobora com o constatado para atividade antidermatofítica dessas moléculas, de que a ação contra os mais variados micro-organismos é dependente da extensão da cadeia alquílica (PERNAK; SOBASZKIEWICZ, MIRSKA, 2003). Relata-se na literatura que a partir de 6 carbonos na cadeia lateral, as moléculas tornam-se mais ativas biologicamente, e que a partir de 10 carbonos a atividade antimicrobiana é ainda consideravelmente mais pronunciada (PERNAK; SOBASZKIEWICZ; MIRSKA, 2003, RANKE et al., 2004).

Referente à CIM que inibiu totalmente o crescimento de 50% dos isolados de *Microsporum* e *Trichophyton* e a média geométrica (MG) dessas concentrações, que foi utilizada inclusive para a escolha das concentrações avaliadas nos testes de toxicidade, os dados são apresentados na tabela 6.

Tabela 6. CIM₅₀ e média geométrica dos 11 SIMs e 3 antifúngicos comerciais (terbinafina – TBF, griseofulvina – GSF e cetoconazol – CTZ) em relação às 4 espécies dermatofíticas – *M. canis* (MCA), *M. gypseum* (MGY), *T. mentagrophytes* (TME) e *T. rubrum* (TRU).

Dermatófitos (n=45)	CIM ₅₀ Sais imidazólicos*							
	C ₄ MImCl	C ₄ MImMeS	C ₄ MImOcS	C ₉ MImMeS	C ₁₀ MImCl	(C ₁₀) ₂ MImCl		
MCA (n=9)	12.50/71.56	12.50/53.35	12.50/37.59	12.50/41.33	1.56/6.04	3.13/7.84		
MGY (n=12)	12.50/71.56	12.50/53.35	12.50/37.59	6.25/20.66	0.39/1.51	3.13/7.84		
TME (n=12)	12.50/71.56	12.50/53.35	25.00/75.19	3.13/10.33	12.50/48.29	3.13/7.84		
TRU (n=12)	12.50/71.56	12.50/53.35	12.50/37.59	3.13/10.33	6.25/24.15	1.56/3.92		
Média Geométrica	12.50/71.56	12.50/53.35	14.87/44.70	5.26/17.37	2.63/10.16	2.63/6.59		
Dermatófitos (n=45)	CIM ₅₀ Sais imidazólicos*					CIM ₅₀ Antifúngicos**		
	C ₁₆ MImCl	C ₁₆ MImMeS	C ₁₆ MImNTf ₂	C ₁₆ MImSaC	C ₁₈ MImCl	TBF	GSF	CTZ
MCA (n=9)	0.05/0.14	0.05/0.12	1.56/2.66	3.13/7.03	6.25/16.84	0.03	0.50	0.50
MGY (n=12)	0.39/1.14	0.05/0.12	1.56/2.66	12.50/28.11	6.25/16.84	0.03	1.00	1.00
TME (n=12)	0.02/0.07	0.05/0.12	3.13/5.32	6.25/14.06	6.25/16.84	0.03	0.50	2.00
TRU (n=12)	0.05/0.14	0.05/0.12	3.13/5.32	1.56/3.51	12.50/33.69	0.03	1.00	1.00
Média Geométrica	0.07/0.20	0.05/0.12	2.21/3.76	4.42/9.94	7.43/20.03	0.03	0.71	1.00

*Valores de CIM₅₀ dos SIMs expressos em µg/mL/nmol/mL. **CIM₅₀ dos antifúngicos em µg/mL. A letra “n” representa o número de isolados fúngicos analisados.

A faixa geral de CIM₅₀, observada para todos os sais e relativa aos 45 dermatófitos, foi de 0.02 a 25.00 µg/mL, com faixa de média geométrica variando entre um mínimo de 0.05 µg/mL para o C₁₆MImMeS a um máximo de 14.87 µg/mL para o C₄MImOcS. A média de CIM₅₀ dos antifúngicos foi de 0.03 µg/mL, 0.71 µg/mL e 1.00 µg/mL para TBF, GSF e CTZ, respectivamente.

Com a MG foi possível realizar-se uma análise mais geral, relacionando-se as CIM's das 4 espécies de dermatófitos investigadas nesse estudo. Logo, com essa perspectiva mais abrangente de concentração, comparou-se a estrutura-atividade dos SIMs, por dois critérios:

1º) SIMs com diferentes tamanhos de cadeia lateral e igual ânion:

O efeito da cadeia alquílica pôde ser observado para:

a) Compostos com ânion cloreto: A MG, em µg/mL, para C₄MImCl, C₁₀MImCl, (C₁₀)₂MImCl, C₁₆MImCl e C₁₈MImCl foi de 12.50, 2.63, 2.63, 0.07 e 7.43, respectivamente. Desse modo, as moléculas mais efetivas em termos de concentração, que apresentaram as menores médias de CIM, foram as com 10 e 16 carbonos na cadeia, sendo que a cadeia hexadecílica foi a que apresentou atividade antidermatofítica *in vitro*, na menor concentração, comparada com todas as demais. O SIM (C₁₀)₂MImCl (Fig. 25), com dois radicais decil e metila na posição 2 do anel imidazólico catiônico, comparado com o C₁₀MImCl (Fig. 24), com apenas um radical decil e metila na posição 3 do anel imidazólico, apresentou a mesma MG de CIM₅₀ de 2.63 µg/mL, porém em nmol/mL o (C₁₀)₂MImCl tem uma CIM um pouco menor (Tab. 6). Além disso, atendendo-se para as CIM₅₀ de cada espécie, para o gênero *Trichophyton*, por exemplo, há "vantagem" do (C₁₀)₂MImCl, que consegue inibir os isolados de TME e TRU em concentrações um pouco menor (1.56 e 3.13 µg/mL) que C₁₀MImCl (6.25 e 12.50 µg/mL). Em contrapartida, para o gênero *Microsporium*, C₁₀MImCl inibe os isolados de MCA e MGY em menor concentração, o que estabelece uma relação de concentração-efeito espécie-específico. Por fim, o C₁₈MImCl comparado ao C₁₆MImCl necessita de uma maior concentração para exercer o efeito antifúngico.

b) Compostos com ânion metanossulfonato: A MG, em µg/mL, para C₄MImMeS, C₉MImMeS e C₁₆MImMeS foi de 12.50, 5.26 e 0.05, respectivamente. Da mesma forma que para os compostos com ânion [Cl], as melhores médias (menores MG) para moléculas com ânion [MeS], foram verificadas para o SIM com

cadeia lateral hexadecil. Comparando-se o C₉MImMeS (Fig. 23), com cadeia lateral constituída de uma parte cíclica (ciclohexil), com o C₁₆MImMeS (Fig. 27), com cadeia lateral maior e totalmente linear, constata-se que o C₁₆MImMeS é ativo contra os dermatófitos em uma menor concentração, porém os dois sais diferem em número de carbonos na cadeia, logo essa é apenas uma relação mais superficial de dose-efeito, visto que para uma correlação mais apropriada ter-se-ia necessidade de igualdade do número de carbonos, ou seja, um SIM com 9 carbonos na cadeia lateral com uma parte cíclica e outro SIM com também 9 carbonos, no entanto, com cadeia lateral reta (normal, linear).

2º) SIMs com diferentes ânions e igual tamanho de cadeia lateral:

O efeito do ânion pôde ser observado para:

a) Compostos com cadeia lateral de 4 carbonos: A MG, em µg/mL, para C₄MImCl, C₄MImMeS e C₄MImOcS foi de 12.50, 12.50 e 14.87, respectivamente. Percebe-se, com isso, que SIMs com ânions mais volumosos como o octanossulfonato exercem atividade antidermatofítica em concentrações discretamente mais elevadas.

b) Compostos com cadeia lateral de 16 carbonos: A MG, em µg/mL, para C₁₆MImCl, C₁₆MImMeS, C₁₆MImNTf₂ e C₁₆MImSaC foi de 0.07, 0.05, 2.21 e 4.42, respectivamente. Tal como para moléculas com menor número de carbonos na cadeia lateral, comentado acima, os SIMs com hexadecil na cadeia lateral e ânions mais volumosos como o N-triflato e salicilato, apresentaram MG de CIM₅₀ mais elevada, configurando-se assim também o importante papel do ânion no delineamento concreto da atividade antifúngica dos compostos. Uma explicação sugestiva para isso é a possível desestabilização eletrostática que ânions mais volumosos poderiam ocasionar, além de certa forma, modificarem a polaridade e geometria das moléculas, o que pode influenciar na interação dos compostos com as células fúngicas (OLIVIER-BOURBIGOU; MAGNA; MORVAN, 2010). O C₁₆MImSaC (Fig. 29), hexadecilmetilimidazólio associado ao ânion salicilato, teoricamente ainda teria a vantagem combinada ao efeito antidermatofítico, de amenizar o processo inflamatório, relatado nos variados casos de dermatofitose, uma vez que o salicilato é, na clínica, reconhecido farmacologicamente pelas suas propriedades anti-inflamatórias e até mesmo analgésicas e antipiréticas (HARDMAN; LIMBIRD, 2003).

Por conseguinte, os resultados mais promissores, referentes às menores concentrações inibitórias, foram observados para os 2 SIMs com 16 átomos de carbono na cadeia lateral e diferentes ânions - C₁₆MImCl (Fig. 26) e C₁₆MImMeS (Fig. 27). Tais compostos foram capazes de inibir os fungos em concentrações extremamente baixas, comparáveis às concentrações observadas para a terbinafina (Tab. 6) e em concentrações mais baixas que as observadas para griseofulvina e cetoconazol (Tab. 6). Esse mesmo perfil é verificado também para os isolados dermatofíticos multirresistentes, para os quais as CIM's dos antifúngicos são elevadas e as CIM's dos compostos químicos, especialmente do C₁₆MImCl e C₁₆MImMeS são bem menores, por exemplo, que as da GSF e do CTZ, (Tab. 2, 3, 4 e 5). Enquanto que para esses 2 SIMs as CIM₅₀ variaram de 0.02 a 0.39 µg/mL (Tab. 6), para outros compostos investigados em relação a atividade antidermatofítica, já foram observadas faixas de CIM de 2.00 – >64.00 µg/mL para derivados tiazólicos sintéticos (OUF et al., 2013), 2.00 – 64.00 µg/mL para peptídeos (SIMONETTI et al., 2009) e 0.25 – 4.00 mg.mL⁻¹ para óleos essenciais (KHOSRAVI, et al., 2013).

A correspondência dos SIMs com os antifúngicos também foi avaliada estatisticamente. As informações dessa análise estatística de comparação dos compostos com a TBF, GSF e CTZ, estão expostas na tabela 7. A partir da referida tabela constatou-se uma correspondência estatística dos SIMs com no mínimo um dos antifúngicos, excetuando-se os 3 SIMs com 4 carbonos na cadeia lateral (C₄MImCl, C₄MImMeS e C₄MImOcS), que não foram estatisticamente equivalentes a nenhum dos três antifúngicos comerciais analisados, em relação a nenhuma das espécies (MCA, MGY, TME e TRU). Para especificamente *T. rubrum* o SIM C₁₈MImCl também não apresentou similaridade estatística com nenhum dos três antifúngicos investigados. Corroborando com isso, CARSON et al. (2009), relataram que C₄MImCl não apresentou atividade contra fungos e bactérias. Eles constataram que as ações antifúngicas e antibacterianas aumentavam com o aumento da cadeia hidrofóbica, frequentemente até um ponto de saturação que pode ser 18 carbonos. (CARSON et al., 2009). Uma possível razão para isso, como já mencionado, pode ter relação com a menor lipossolubilidade de compostos com cadeia lateral curta e com a concentração micelar crítica dos compostos com cadeia lateral mais longa (LUCZAK et al., 2009).

Tabela 7. Comparação estatística dos 11 SIMs com os 3 antifúngicos comerciais (terbinafina – TBF, griseofulvina – GSF e cetoconazol – CTZ) em relação às 4 espécies dermatofíticas – *M. canis* (MCA), *M. gypseum* (MGY), *T. mentagrophytes* (TME) e *T. rubrum* (TRU).

	CIM			CIM	
	Mediana*	[25%; 75%]**		Mediana*	[25%; 75%]**
MCA (n=9)			MGY (n=12)		
C₄MImCI	12.50 ^d	[12.50; 50.00]	C₄MImCI	12.50 ^d	[12.50; 31.50]
C₄MImMeS	12.50 ^e	[12.50; 12.50]	C₄MImMeS	12.50 ^e	[12.50; 25.00]
C₄MImOcS	12.50 ^f	[12.50; 12.50]	C₄MImOcS	18.75 ^f	[12.50; 50.00]
C₉MImMeS	12.50 ^b	[6.25; 12.50]	C₉MImMeS	6.25 ^{b,c}	[3.13; 6.25]
C₁₀MImCI	1.56 ^{a,b,c}	[1.56; 3.13]	C₁₀MImCI	0.39 ^{a,b,c}	[0.39; 0.78]
(C₁₀)₂MImCI	3.13 ^{a,b,c}	[1.56; 3.13]	(C₁₀)₂MImCI	3.13 ^{a,b,c}	[2.35; 3.13]
C₁₆MImCI	0.05 ^{a,b,c}	[0.05; 0.39]	C₁₆MImCI	0.39 ^{a,b,c}	[0.24; 0.39]
C₁₆MImMeS	0.05 ^{a,b,c}	[0.05; 0.39]	C₁₆MImMeS	0.05 ^{a,b,c}	[0.05; 0.59]
C₁₆MImNTf₂	1.56 ^{a,b,c}	[0.20; 1.56]	C₁₆MImNTf₂	1.56 ^{b,c}	[1.56; 3.13]
C₁₆MImSaC	3.13 ^{a,b,c}	[1.56; 3.13]	C₁₆MImSaC	12.50 ^{b,c}	[1.56; 12.50]
C₁₈MImCI	6.25 ^b	[6.25; 12.50]	C₁₈MImCI	6.25 ^b	[6.25; 12.50]
TBF	0.09 ^a	[0.03; 0.56]	TBF	0.06 ^a	[0.03; 0.13]
GSF	0.50 ^b	[0.38; 16.50]	GSF	1.00 ^b	[1.00; 2.00]
CTZ	0.50 ^c	[0.50; 1.30]	CTZ	1.00 ^c	[1.00; 1.00]
p < 0.05***			p < 0.05***		
	CIM			CIM	
	Mediana*	[25%; 75%]**		Mediana*	[25%; 75%]**
TME (n=12)			TRU (n=12)		
C₄MImCI	12.50 ^d	[12.50; 12.50]	C₄MImCI	12.50 ^d	[6.25; 12.50]
C₄MImMeS	12.50 ^e	[12.50; 12.50]	C₄MImMeS	12.50 ^e	[12.50; 12.50]
C₄MImOcS	25.00 ^f	[9.38; 37.50]	C₄MImOcS	12.50 ^f	[6.25; 18.75]
C₉MImMeS	3.13 ^{a,b,c}	[0.05; 3.13]	C₉MImMeS	3.13 ^{b,c}	[2.35; 3.13]
C₁₀MImCI	12.50 ^{a,b,c}	[0.20; 12.50]	C₁₀MImCI	3.91 ^{b,c}	[0.39; 6.25]
(C₁₀)₂MImCI	3.13 ^{a,b,c}	[0.49; 3.13]	(C₁₀)₂MImCI	1.56 ^{a,b,c}	[1.56; 1.56]
C₁₆MImCI	0.02 ^{a,b,c}	[0.02; 1.56]	C₁₆MImCI	0.05 ^{a,b,c}	[0.05; 0.05]
C₁₆MImMeS	0.05 ^{a,b,c}	[0.05; 0.39]	C₁₆MImMeS	0.05 ^{a,b,c}	[0.05; 0.05]
C₁₆MImNTf₂	3.13 ^{a,b,c}	[1.56; 3.13]	C₁₆MImNTf₂	3.13 ^{b,c}	[3.13; 3.13]
C₁₆MImSaC	6.25 ^{a,b,c}	[1.56; 6.25]	C₁₆MImSaC	1.56 ^{a,b,c}	[1.56; 3.13]
C₁₈MImCI	6.25 ^{b,c}	[6.25; 12.50]	C₁₈MImCI	12.50 ^g	[6.25; 12.50]
TBF	0.05 ^a	[0.03; 0.13]	TBF	0.03 ^a	[0.03; 0.06]
GSF	0.75 ^b	[0.50; 2.00]	GSF	1.50 ^b	[1.00; 2.00]
CTZ	2.00 ^c	[0.25; 2.00]	CTZ	1.00 ^c	[1.00; 1.00]
p < 0.05***			p < 0.05***		

*Medianas seguidas da mesma letra não diferiram entre si no teste de Dunn.** O valor de 25% representa a concentração (µg/mL) de 1/4 da amostra (primeiro quartil) e 75% a concentração (µg/mL) de 3/4 da amostra (terceiro quartil).***Diferença estatística; “n” representa o número de isolados fúngicos analisados.

Considerando as 4 espécies dermatofíticas na tabela 7, os SIMs que para todos os dermatófitos apresentaram correspondência estatística aos 3 antifúngicos - terbinafina, griseofulvina e cetoconazol, foram $(C_{10})_2MImCl$, $C_{16}MImCl$ e $C_{16}MImMeS$. Em uma comparação estatística de alguns sais com um dos principais antifúngicos de referência para dermatofitose, a TBF, observa-se mais visualmente, nos gráficos boxplot (Fig. 31), as semelhanças e diferenças entre os compostos e a TBF.

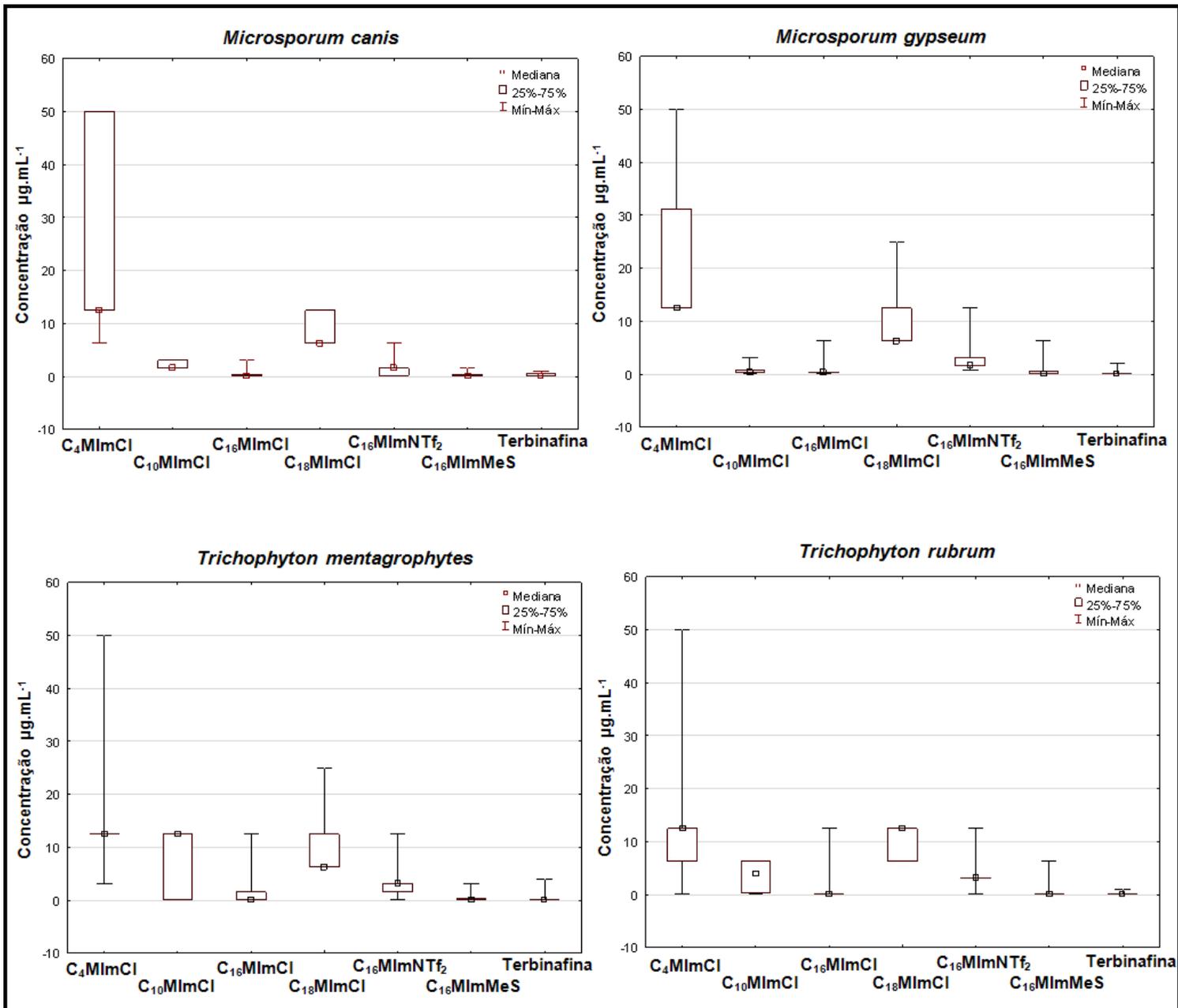


Figura 31. Gráfico *boxplot*, com a mediana, primeiro (25%) e terceiro (75%) quartil e mínimo e máximo das CIM's de seis SIMs (C_4MImCl , $C_{10}MImCl$, $C_{16}MImCl$, $C_{18}MImCl$, $C_{16}MImNTf_2$ e $C_{16}MImMeS$) e um antifúngico (terbinafina – TBF).

A partir do boxplot (gráfico de caixa), que é utilizado para avaliar a distribuição empírica dos dados, consegue-se observar ainda mais claramente a semelhança de alguns SIMs com a terbinafina. Estreitando a relação comparativa, fica claramente evidenciado que para *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*, o SIM que mais se aproxima ao comportamento de dose-efeito antidermatofítico, se igualando estatisticamente a terbinafina, é o C₁₆MImMeS.

Quanto à observação do crescimento dermatofítico na microplaca do teste de suscetibilidade, nota-se uma determinada deformação no desenvolvimento do isolado de *T. mentagrophytes* pós-tratamento com os SIMs C₁₆MImCl e C₁₆MImMeS, o que não é igualmente observado para o C₁₆MImNTf₂ e o antifúngico cetoconazol (Fig. 32). A alteração fenotípica no crescimento do dermatófito foi, de modo especial, mais evidente para o tratamento com C₁₆MImCl. A microplaca foi propositalmente deixada na estufa por tempo prolongado, 10 dias a mais pós-leitura da CIM, para também visualmente retratar-se o potencial fungicida do C₁₆MImMeS, demonstrado no crescimento fúngico até determinada concentração, com posterior inibição total e permanente da espécie multirresistente analisada (Fig. 32).

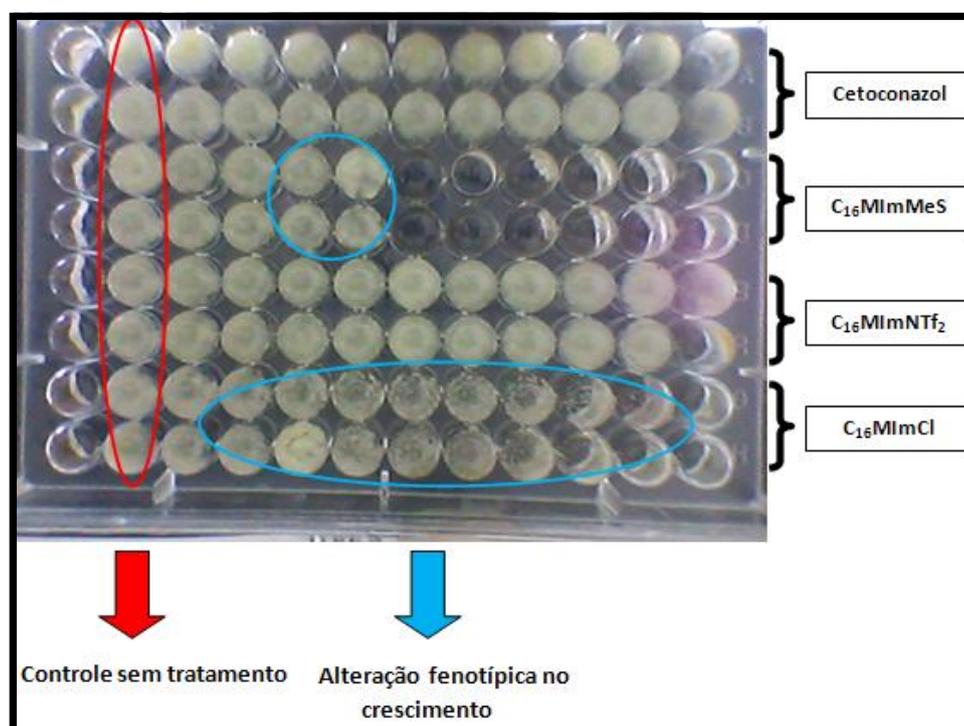


Figura 32. Imagem de uma microplaca do teste de suscetibilidade, após 14 dias de incubação a 30 °C, com o dermatófito *Trichophyton mentagrophytes* (TME 16*), pós-tratamento com os SIMs - C₁₆MImMeS, C₁₆MImNTf₂ e C₁₆MImCl e antifúngico cetoconazol.

Corroborando com o controle de qualidade dos testes de suscetibilidade supracitados, as CIM's das cepas-referência de *Candida* estavam de acordo com o preconizado na CLSI (M27-A3, 2008 e M27-S4, 2012), para o cetoconazol, conforme dados apresentados na tabela 8, sendo que a CIM das 3 espécies de *Candida* foi de 0.03 µg/mL para esse antifúngico. Os SIMs também apresentaram atividade antileveduriforme, como demonstrado na tabela 8, com faixa geral de CIM de 0.20 – 3.13 µg/mL. Com isso, evidencia-se que o espectro de ação dos SIMs não se limita apenas aos dermatófitos, mas também às leveduras, com potencial antifúngico que além de fortemente efetivo, pelas baixas concentrações, é consideravelmente amplo. A ação contra espécies do gênero *Candida*, já foi relatada para o C₁₆MImCl (SCHREKKER et al., 2013; BERGAMO et al., 2014).

Tabela 8. CIM dos 11 SIMs e antifúngico cetoconazol (CTZ) em relação a cepas leveduriformes-referência: *Candida albicans* (CA) ATCC 18804, ATCC 24433 e *Candida tropicalis* (CT) ATCC 750.

Leveduras (n=3)	CIM Sais imidazólicos*					
	C ₄ MImCl	C ₄ MImMeS	C ₄ MImOcS	C ₉ MImMeS	C ₁₀ MImCl	(C ₁₀) ₂ MImCl
CA ATCC 18804	1.56/8.95	1.56/6.67	1.56/4.70	3.13/10.33	1.56/6.04	1.56/3.92
CA ATCC 24433	1.56/8.95	1.56/6.67	1.56/4.70	1.56/5.17	1.56/6.04	3.13/7.83
CT ATCC 750	1.56/8.95	1.56/6.67	1.56/4.70	1.56/5.17	1.56/6.04	3.13/7.83
Leveduras (n=3)	CIM Sais imidazólicos*					CIM Antifúngico**
	C ₁₆ MImCl	C ₁₆ MImMeS	C ₁₆ MImNTf ₂	C ₁₆ MImSaC	C ₁₈ MImCl	CTZ
CA ATCC 18804	0.39/1.14	0.20/0.49	0.78/1.33	0.20/0.44	3.13/8.42	0.03
CA ATCC 24433	0.39/1.14	0.20/0.49	0.78/1.33	0.20/0.44	3.13/8.42	0.03
CT ATCC 750	0.39/1.14	0.20/0.49	0.78/1.33	0.20/0.44	3.13/8.42	0.03

*Valores de CIM dos SIMs expressos em µg/mL/nmol/mL. **CIM do antifúngico em µg/mL. A letra "n" representa o número de isolados fúngicos analisados.

Para finalizar as determinações da CIM, a suscetibilidade de 8 isolados dermatofíticos foi definida também em CSD, conforme tabela 9. Os valores de CIM, em CSD, de toda a série de SIMs e do cetoconazol, foram os mesmos que os estabelecidos em meio RPMI 1640 (contendo L-glutamina, sem bicarbonato de sódio, tamponado a pH 7.0 com MOPS 0.165 mol.L⁻¹), que é o meio de cultura preconizado pela CLSI (M38-A2, 2008). Desse modo, *a priori*, não há uma interferência direta do meio de cultura nos valores de CIM, por uma possível interação dos compostos químicos com o meio, porém evidentemente, análises

outras, mais aprofundadas e específicas, futuramente deverão ser executadas para uma confirmação concreta disso. Esse teste apenas constitui-se em uma investigação prévia do comportamento dos SIMs em diferentes condições experimentais.

Tabela 9. Suscetibilidade dos isolados de *M. canis* (MCA), *M. gypseum* (MGY), *T. mentagrophytes* (TME) e *T. rubrum* (TRU) em relação ao tratamento *in vitro* com 11 SIMs e 1 antifúngico comercial (cetoconazol – CTZ) em Caldo Sabouraud Dextrose (CSD).

Dermatófitos (n=8)	CIM Sais imidazólicos**					
	C ₄ MImCl	C ₄ MImMeS	C ₄ MImOcS	C ₉ MImMeS	C ₁₀ MImCl	(C ₁₀) ₂ MImCl
MCA 01	12.50/71.56	12.50/53.35	12.50/37.59	6.25/20.66	1.56/6.04	3.13/7.84
MCA 29	12.50/71.56	3.13/13.34	12.50/37.59	6.25/20.66	1.56/6.04	1.56/3.92
MGY 42	50.00/286.25	25.00/106.70	12.50/37.59	3.13/10.33	0.20/0.75	6.25/15.66
MGY 45	50.00/286.25	25.00/106.70	50.00/150.38	6.25/20.66	0.39/1.51	3.13/7.84
TME 16*	12.50/71.56	12.50/53.35	50.00/150.38	3.13/10.33	12.50/48.29	12.50/31.32
TME 18	6.25/35.78	6.25/26.67	1.56/4.70	0.05/0.16	0.05/0.19	0.20/0.49
TRU 20	12.50/71.56	12.50/53.35	12.50/37.59	3.13/10.33	1.56/6.04	1.56/3.92
TRU 23	12.50/71.56	12.50/53.35	25.00/75.19	3.13/10.33	6.25/24.15	1.56/3.92
Faixa de CIM (µg/mL)	6.25–50.00	3.13–25.00	1.56–50.00	0.05–6.25	0.05–12.50	0.20–12.50
Dermatófitos (n=8)	CIM Sais imidazólicos**				CIM Antifúngicos***	
	C ₁₆ MImCl	C ₁₆ MImMeS	C ₁₆ MImNTf ₂	C ₁₆ MImSaC	C ₁₈ MImCl	CTZ
MCA 01	0.39/1.14	0.39/0.97	1.56/2.66	3.13/7.03	12.50/33.69	0.50
MCA 29	0.05/0.14	0.05/0.12	0.39/0.66	3.13/7.03	6.25/16.84	0.06
MGY 42	0.39/1.14	0.05/0.12	1.56/2.66	12.50/28.11	25.00/67.38	1.00
MGY 45	0.39/1.14	0.39/0.97	1.56/2.66	0.78/1.76	25.00/67.38	0.50
TME 16*	1.56/4.56	0.78/1.94	3.13/5.32	12.50/28.11	6.25/16.84	16.00
TME 18	0.02/0.07	0.05/0.12	3.13/5.32	1.56/3.51	6.25/16.84	2.00
TRU 20	0.05/0.14	0.05/0.12	3.13/5.32	1.56/3.51	12.50/33.69	1.00
TRU 23	0.05/0.14	0.05/0.12	3.13/5.32	1.56/3.51	6.25/16.84	1.00
Faixa de CIM (µg/mL)	0.02–1.56	0.05–0.78	0.39–3.13	0.78–12.50	6.25–25.00	0.06–16.00

*Isolado multirresistente. **Valores de CIM dos SIMs expressos em µg/mL/nmol/mL. ***CIM do antifúngico em µg/mL. A letra “n” representa o número de isolados fúngicos analisados.

No que refere-se as CFM`s, apenas dois SIMs foram fungicidas (C₁₆MImCl e C₁₆MImMeS), sendo que os valores das CFM`s dos mesmos e da terbinafina, antifúngico sabidamente fungicida para os dermatófitos, estão indicados na tabela 10 para o gênero *Microsporium* e tabela 11 para *Trichophyton*. Os demais SIMs

(C₄MImCl, C₄MImMeS, C₄MImOcS, C₉MImMeS, C₁₀MImCl, (C₁₀)₂MImCl, C₁₆MImNTf₂, C₁₆MImSaC e C₁₈MImCl) e antifúngicos (GSF e CTZ) foram fungistáticos, nas concentrações testadas (CIM, 2xCIM e 4xCIM), apenas impedindo o crescimento dermatofítico, mas não matando de fato as espécies.

Tabela 10. Concentração fungicida mínima (CFM), em µg/mL, dos SIMs C₁₆MImCl e C₁₆MImMeS e antifúngico terbinafina em relação aos dermatófitos do gênero *Microsporum*.

Dermatófitos	C₁₆MImCl	C₁₆MImMeS	Terbinafina
<i>M. canis</i>			
MCA 01	1.56 (4xCIM)	1.56 (4xCIM)	0.03 (CIM)
MCA 29	0.20 (4xCIM)	0.20 (4xCIM)	0.13 (CIM)
MCA 32	Fungistático	0.20 (4xCIM)	0.13 (CIM)
MCA 33	0.20 (4xCIM)	6.25 (4xCIM)	---
MCA 36*	Fungistático	6.25 (4xCIM)	Fungistático
MCA W3	1.56 (4xCIM)	0.20 (4xCIM)	0.06 (CIM)
MCA 38	0.20 (4xCIM)	0.80 (4xCIM)	0.03 (CIM)
MCA 39	0.80 (4xCIM)	0.20 (4xCIM)	0.03 (CIM)
MCA 40*	Fungistático	0.20 (4xCIM)	Fungistático
<i>M. gypseum</i>			
MGY 42	1.56 (4xCIM)	0.20 (4xCIM)	0.03 (CIM)
MGY 45	1.56 (4xCIM)	1.56 (4xCIM)	0.03 (CIM)
MGY 46	1.56 (4xCIM)	3.13 (4xCIM)	0.03 (CIM)
MGY 48	6.25 (4xCIM)	6.25 (4xCIM)	0.13 (CIM)
MGY 49	Fungistático	0.20 (4xCIM)	0.03 (CIM)
MGY 50	12.50 (4xCIM)	0.20 (4xCIM)	0.13 (CIM)
MGY 51	1.56 (4xCIM)	0.20 (4xCIM)	0.25 (CIM)
MGY 52	1.56 (4xCIM)	6.25 (4xCIM)	0.13 (CIM)
MGY 53	1.56 (4xCIM)	0.20 (4xCIM)	0.06 (CIM)
MGY 54	1.56 (4xCIM)	0.20 (4xCIM)	0.06 (CIM)
MGY 57	Fungistático	0.20 (4xCIM)	0.03 (CIM)
MGY 58*	Fungistático	12.50 (4xCIM)	Fungistático

*Isolados dermatofíticos multirresistentes.

Para os isolados clínicos de *M. canis*, C₁₆MImCl não foi fungicida para apenas 3 isolados (1 sensível e 2 multirresistentes), sendo fungicida para os demais em concentrações correspondentes a 4xCIM (Tab. 10). Ainda em relação à MCA, C₁₆MImMeS foi fungicida para todos os isolados, em concentrações 4 vezes mais elevadas que a CIM e a terbinafina, também fungicida para todos na própria concentração inibitória mínima, com exceção dos multirresistentes. Para *M. gypseum*, observa-se o mesmo perfil fungicida/fungistático dos SIMs e TBF, mencionado para *M. canis* (Tab. 10).

Tabela 11. Concentração fungicida mínima (CFM), em µg/mL, dos SIMs C₁₆MImCl e C₁₆MImMeS e antifúngico terbinafina em relação aos dermatófitos do gênero *Trichophyton*.

Dermatófitos	C ₁₆ MImCl	C ₁₆ MImMeS	Terbinafina
<i>T. mentagrophytes</i>			
TME 16*	Fungistático	3.13 (4xCIM)	Fungistático
TME 18	0.08 (4xCIM)	0.20 (4xCIM)	0.06 (CIM)
TME 31	12.50 (4xCIM)	12.50 (4xCIM)	0.03 (CIM)
TME 32	0.08 (4xCIM)	0.40 (4xCIM)	0.06 (CIM)
TME 33	0.08 (4xCIM)	0.08 (4xCIM)	0.03 (CIM)
TME 34*	Fungistático	1.56 (4xCIM)	Fungistático
TME 35	12.50 (4xCIM)	0.20 (4xCIM)	---
TME 36	0.20 (4xCIM)	0.40 (4xCIM)	---
TME 38	6.25 (4xCIM)	0.20 (4xCIM)	0.03 (CIM)
TME 40	0.08 (4xCIM)	0.20 (4xCIM)	0.03 (CIM)
TME 44	0.08 (4xCIM)	0.20 (4xCIM)	0.03 (CIM)
TME 46	Fungistático	1.56 (4xCIM)	0.13 (CIM)
<i>T. rubrum</i>			
TRU 20	0.20 (4xCIM)	0.20 (4xCIM)	0.06 (CIM)
TRU 23	0.20 (4xCIM)	0.20 (4xCIM)	0.03 (CIM)
TRU 25*	Fungistático	6.25 (4xCIM)	Fungistático
TRU 40	0.20 (4xCIM)	0.20 (4xCIM)	0.06 (CIM)
TRU 42	0.20 (4xCIM)	0.08 (4xCIM)	0.03 (CIM)
TRU 43*	Fungistático	6.25 (4xCIM)	0.03 (CIM)
TRU 46	Fungistático	0.20 (4xCIM)	0.03 (CIM)
TRU 48	0.20 (4xCIM)	0.20 (4xCIM)	0.03 (CIM)
TRU 49	Fungistático	0.40 (4xCIM)	0.03 (CIM)
TRU 50	0.20 (4xCIM)	0.20 (4xCIM)	0.06 (CIM)
TRU 52	Fungistático	0.20 (4xCIM)	0.03 (CIM)
TRU 53	0.20 (4xCIM)	0.20 (4xCIM)	---

*Isolados dermatofíticos multirresistentes.

Referente aos isolados de *Trichophyton*, dados semelhantes à *Microsporium* foram constatados. C₁₆MImCl foi fungicida para a maioria dos isolados, em 4xCIM, excetuando-se alguns isolados sensíveis e multirresistentes (TME 16*, TME 34*, TME 46*, TRU 25*, TRU 43*, TRU 46, TRU 49 e TRU 52), os quais teve ação fungistática, apenas impedindo o crescimento das espécies (Tab. 11). C₁₆MImMeS foi fungicida para absolutamente todos os isolados tricofíticos, sempre em concentrações 4 vezes mais altas que a CIM e por fim, TBF apenas não exerceu efeito fungicida contra 3 isolados multirresistentes (TME 16*, TME 34* e TRU 25*; Tab. 11).

Relacionando-se os dados das tabelas 10 e 11 supracitados, o efeito fungicida dos SIMs C₁₆MImCl, C₁₆MImMeS e antifúngico TBF foi quantitativamente

demonstrado, em percentagem, em função da amplitude de ação sobre os isolados e correlacionado com a CIM₅₀, como exposto na figura 33.

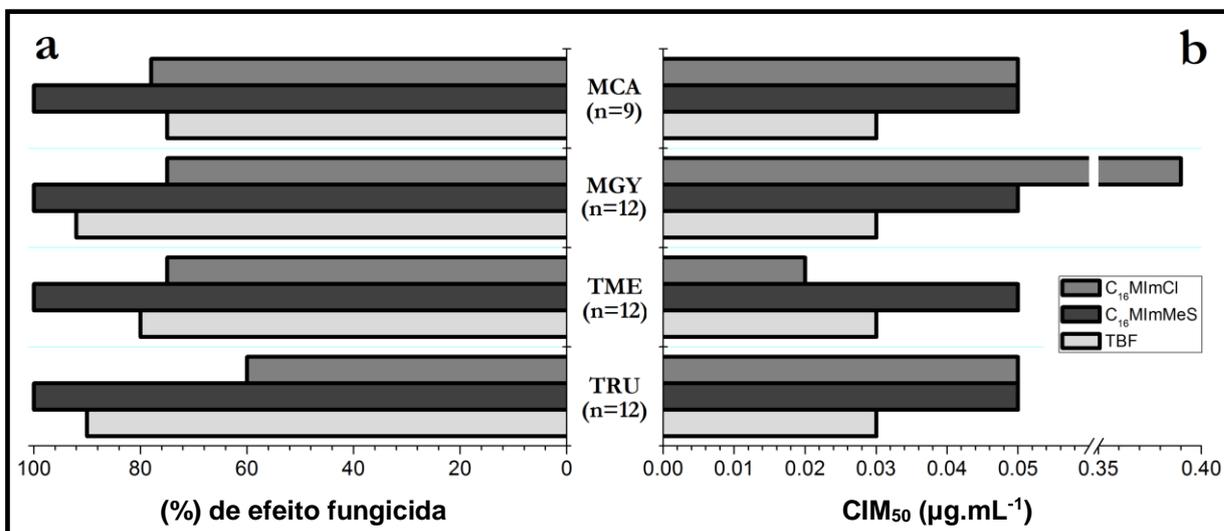


Figura 33. Relação do efeito fungicida (a) e da CIM₅₀ (b) dos SIMs – C₁₆MImCl, C₁₆MImMeS e antifúngico terbinafina (TBF).

Pela análise dos gráficos da figura acima, observa-se referente ao efeito fungicida um mesmo padrão para MCA, MGY, TME e TRU. Há uma prevalência de alta percentagem de ação fungicida particularmente para o C₁₆MImMeS, levando a morte 100% das espécies dermatofíticas analisadas, em uma concentração de 4x CIM₅₀ (0.20 µg/mL), para as 4 espécies, que é uma concentração extremamente baixa. O composto C₁₆MImCl foi fungicida para aproximadamente 80% dos isolados de MCA, MGY e TME e para aproximadamente 60% dos isolados de TRU, em uma faixa de 4x CIM₅₀ de 0.08 a 1.60 µg/mL. Para TBF o efeito fungicida mínimo foi sobre 76% dos isolados, no caso de *M. canis*, e máximo sobre 92% dos mesmos, no caso de *M. gypseum* e *T. rubrum*, com CIM₅₀, que corresponde a CFM₅₀ no caso, de 0.03 µg/mL, para todas as espécies, também uma concentração baixíssima.

5.1.2. Análise do efeito sobre a micromorfologia dermatofítica

5.1.2.1. Microscopia ótica (MO)

Quanto à avaliação estrutural da micromorfologia dos dermatófitos pós-tratamento, em concentrações sub-inibitórias (CIM/2), com especificamente 3 SIMs (C₁₆MImCl, C₁₆MImMeS e C₁₆MImNTf₂), as imagens das lâminas examinadas, em duplicata, por microscopia ótica, constam na figura 34.

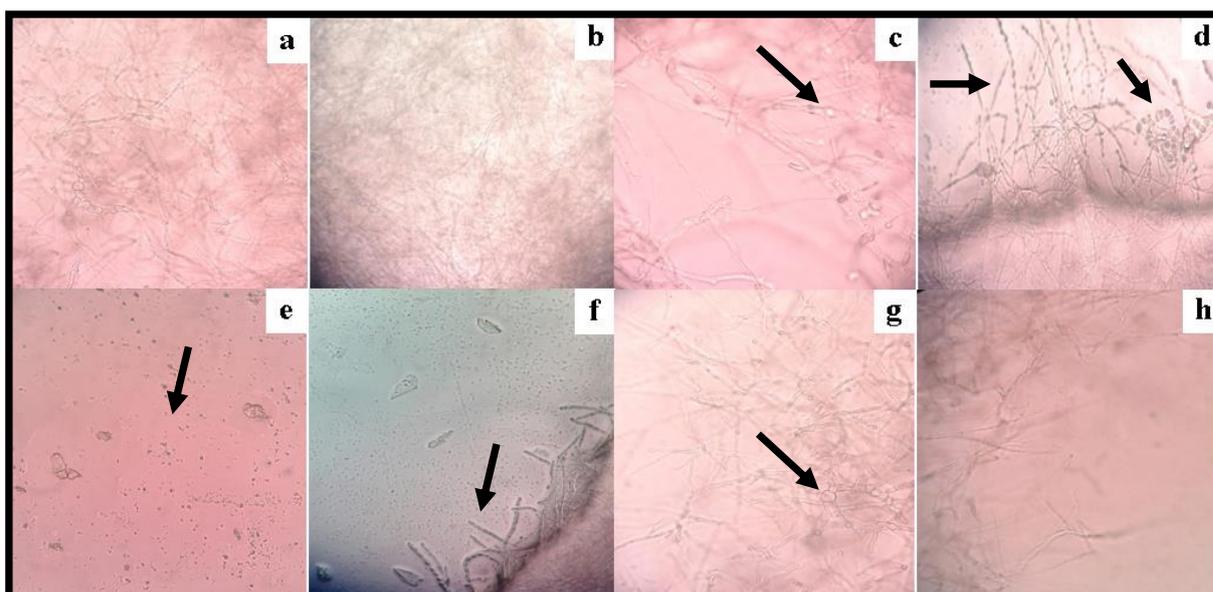


Figura 34. Imagens da micromorfologia de *T. mentagrophytes* (TME 16*) pós-tratamento *in vitro* com 3 SIMs, em concentrações sub-inibitórias; (a, b) – controle sem tratamento, (c, d) – C₁₆MImCl, (e, f) – C₁₆MImMeS e (g, h) – C₁₆MImNTf₂.

Pôde-se observar para o isolado multirresistente de *T. mentagrophytes* (TME 16*), no controle sem tratamento (Fig. 34 a, b) um campo visual repleto de hifas, com crescimento abundante, que estão relativamente íntegras e com aspecto normal, típicas da espécie. Pós-incubação *in vitro* com C₁₆MImCl, constatou-se a presença de numerosos clamidoconídios (Fig. 34 c, d; evidenciados pela seta), intercalares nas hifas, que têm função de resistência, semelhante a dos esporos bacterianos, formando-se quando há condições mais adversas e de evidente risco ao desenvolvimento fúngico. Ainda para C₁₆MImCl percebe-se também um efeito de ressecamento das hifas (Fig. 34 d; evidenciado pela seta). Para C₁₆MImMeS, verificou-se uma área visual bem mais limpa (Fig. 34 e, f) que o controle sem tratamento, com sinais de morte celular (Fig. 34 e, evidenciado pela seta) e com raras formas hifais pequenas, deformadas e com aspecto desidratado/enrugado (Fig. 34 f, evidenciadas pela seta). Em relação ao C₁₆MImNTf₂ as aparentes diferenças (Fig. 34 g, h) comparadas com o controle sem tratamento (Fig. 34 a, b) não foram tão evidentes como no caso dos outros dois SIMs analisados, notando-se alguns clamidoconídios (Fig. 34 g, evidenciados pela seta) e um aglomerado de hifas apenas um pouco menos intenso (Fig. 34 h) que o observado para *T. mentagrophytes* sem tratamento (Fig. 34 b). Dalla Lana (2014) analisou o efeito sobre a micromorfologia, também de um isolado multirresistente de TME, do

tratamento combinado *in vitro*, de terbinafina (2.00 µg/mL) com griseofulvina (32.00 µg/mL), constatando para essa associação semelhantes alterações na micromorfologia da espécie, em comparação com o controle não tratado, e a ocorrência, tal como na figura 34 observado, de numerosos clamidoconídios.

5.1.2.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Com relação ao MEV, as evidentes diferenças em *T. mentagrophytes* pós-tratamento com os SIMs C₁₆MImCl, C₁₆MImMeS e C₁₆MImNTf₂ são apresentadas na figura 35. No controle não tratado (Fig. 35 a, b) evidencia-se um conjunto de hifas íntegras reunidas de modo compacto, denso e firme, sem alterações micromorfológicas perceptíveis. Para C₁₆MImCl, observa-se desagregação do sistema de hifas da espécie (Fig. 35 c) e desidratação do aglomerado hifal (Fig. 35 d). Tendo em consideração as alterações ocasionadas por C₁₆MImCl, constata-se modificações na morfologia semelhantes por C₁₆MImMeS (Fig. 35 e, f), porém com maior intensidade de dano, quando compara-se com o controle sem tratamento (Fig. 35 a, b). Com C₁₆MImMeS ocorre forte fragmentação (Fig. 35 e) e acentuado ressecamento do agregado de hifas de TME 16* (Fig. 35 f). Dessa forma, sugere-se especialmente para os SIMs C₁₆MImCl e C₁₆MImMeS um estresse osmótico ocasionado em TME (Fig. 35 d, f, respectivamente), já que em um meio na presença de sal (solução aquosa com os SIMs), é possível que as células, de uma maneira em geral, percam água para a solução e reduzam seu volume, assumindo um aspecto mais ressecado, caso não haja uma resposta fúngica osmoadaptativa (SOLOMON; BERG; MARTIN, 2002; DURAN; CARY; CALVO, 2010). Em comparação com C₁₆MImCl e C₁₆MImMeS o arranjo e a forma das hifas dermatofíticas, pós-tratamento com C₁₆MImNTf₂, foram notoriamente mais conservados, com a visualização até mesmo de hifas íntegras (Fig. 35 g, h), o que certifica a possibilidade de C₁₆MImNTf₂ ocasionar um dano micromorfológico mais ameno e superficial em *T. mentagrophytes*. Fazendo-se uma relação com a estrutura dos 3 SIMs, o ânion bis(trifluorometilsulfonil)amida, presente em C₁₆MImNTf₂, é mais volumoso, comparado aos ânions cloreto e mesilato.

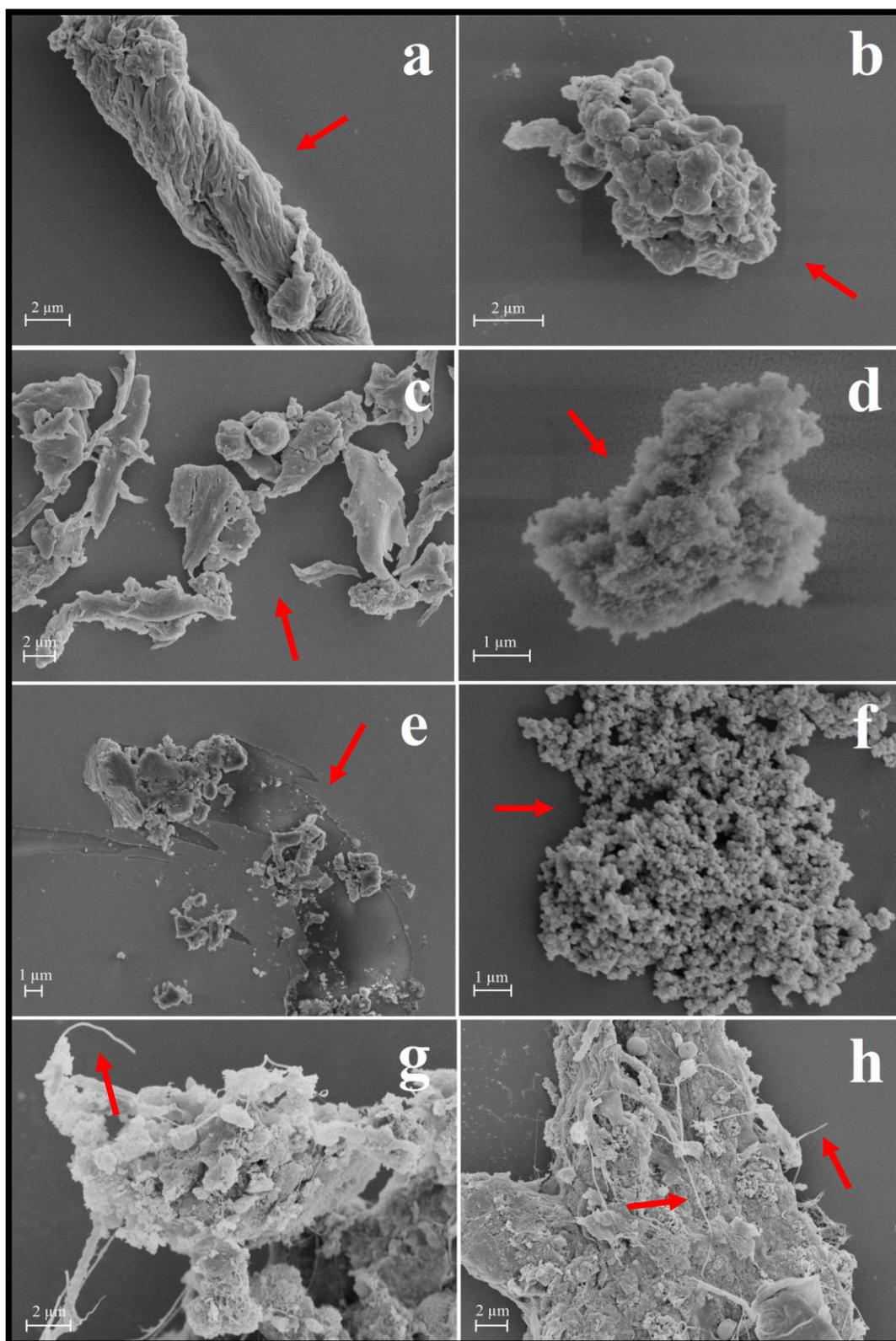


Figura 35. Imagens da microscopia eletrônica de varredura de *T. mentagrophytes* (TME 16*) pós-tratamento *in vitro* com 3 SIMs, em concentrações sub-inibitórias; (a, b) – controle sem tratamento, (c, d) – C₁₆MImCl, (e, f) – C₁₆MImMeS e (g, h) – C₁₆MImNTf₂.

Barlian et al. (2011) relataram alterações micromorfológicas em *T. mentagrophytes*, constatadas também por MEV, semelhantes às observadas com os SIMs, porém com um liofilizado da secreção da glândula granular de *Duttaphrynus melanostictus*. Os autores observaram enrugamento das hifas de TME, bem como o surgimento de poros nas superfícies tubulares. Além disso, modificações na superfície celular de *T. mentagrophytes*, com formação de sulcos e vesículas, “hifas franzidas” e dissolução da parede celular, foram descritas como consequência de um tratamento combinado *in vitro* com óleos essenciais (timol 0.2% e óleo de melaleuca 1.6%), sais (cloreto de sódio a 10%) e aquecimento da suspensão (INOUYE et al., 2007). Os autores ressaltam que a adição de sal potencializou a ação fungicida da combinação, que pode ser utilizada como um “escalda-pés” para os casos de *tinea pedis* (INOUYE et al., 2007). Yamaguchi et al. (2009) publicaram o efeito do canfeno sintético tiossemicarbazida sobre a morfologia de TME, isolado de onicomicose dermatofítica, referindo-se efeitos danosos às hifas da espécie, com fragilização da parede celular, analisados nas imagens de MEV, a partir de uma concentração de 55 nmol/mL ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) do composto. $\text{C}_{16}\text{MImCl}$ e $\text{C}_{16}\text{MImMeS}$, os dois SIMs que tiveram uma ação mais considerável na micromorfologia do *Trichophyton*, provocaram alterações nas hifas do isolado multirresistente, na concentração de 2.28 nmol/mL e 0.97 nmol/mL, respectivamente.

5.1.3. Análise do dano celular dermatofítico

Em conformidade com o prejuízo micromorfológico supracitado, ocasionado nos dermatófitos, por $\text{C}_{16}\text{MImCl}$, $\text{C}_{16}\text{MImMeS}$ e $\text{C}_{16}\text{MImNTf}_2$, o dano celular total também foi elevado, sendo que as percentagens de dano são apresentadas nos gráficos da figura 36. Para CTZ, todas as percentagens de dano foram maiores que 80%, o que está de acordo com os parâmetros estabelecidos pela CLSI (M38-A2, 2008), a qual preconiza como CIM para esse antifúngico, uma redução no crescimento dos dermatófitos de no mínimo 80% (turbidez de 80% ou mais). Para $\text{C}_{16}\text{MImCl}$, observou-se um dano celular mínimo de 60% para um isolado de *M. canis*, e para os demais um dano mínimo de 80%.

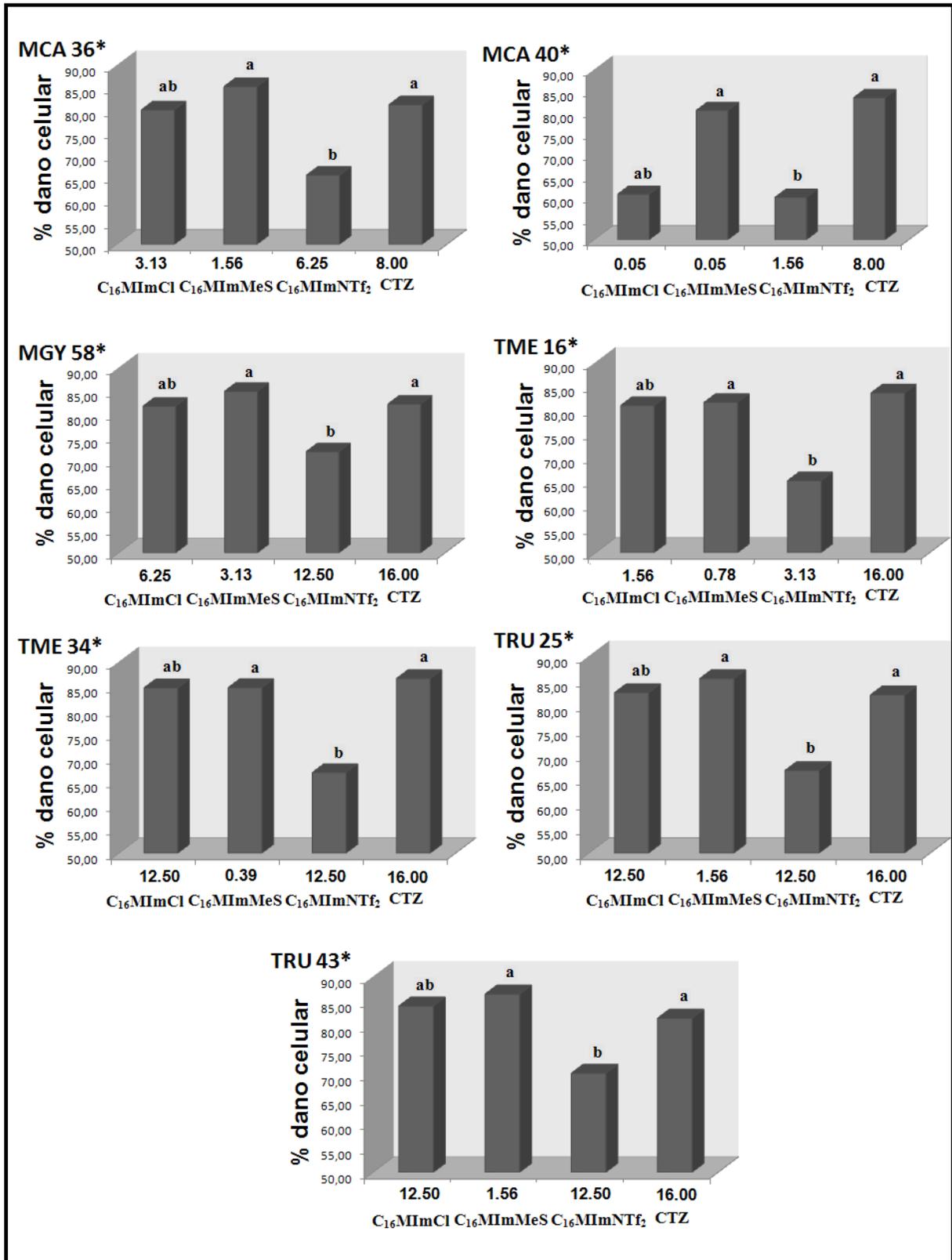


Figura 36. Representação gráfica do dano celular dos isolados multirresistentes das 4 espécies dermatofíticas – *M. canis* (MCA), *M. gypseum* (MGY), *T. mentagrophytes* (TME) e *T. rubrum* (TRU), expresso em percentagem, pós-tratamento com os SIMS C₁₆MimCl, C₁₆MimMeS, C₁₆MimNTf₂ e cetoconazol (CTZ). Barras com a mesma letra são estatisticamente equivalentes.

Com C₁₆MImMeS constatou-se as mais elevadas DC%, com um mínimo de 80% para *M. canis* e um máximo de aproximadamente 87% para *T. rubrum* (valor inclusive maior que o encontrado para CTZ), o que é um dado importante visto que *T. rubrum* é um dos agentes etiológicos mais comumente isolado dos casos de dermatofitose. Em contrapartida, C₁₆MImNTf₂ foi o SIM, comparado aos sais com ânion cloreto e metanossulfonato, que apresentou as mais baixas percentagens de dano, com uma DC% mínima de cerca de 60% para *M. canis* e máxima de cerca de 70% para *T. rubrum*. Percebeu-se que, em geral, os isolados do gênero *Trichophyton* foram os mais sensíveis aos SIMs avaliados. Quanto à análise estatística, apenas as percentagens de dano do C₁₆MImNTf₂ foram estatisticamente inferiores às do CTZ. Os dois outros compostos imidazólicos - C₁₆MImCl e C₁₆MImMeS, ocasionaram danos aos sete isolados dermatofíticos que foram equivalentes, de modo estatístico, ao antifúngico imidazólico, utilizado como substância referência. Dalla Lana (2014) analisou o efeito da associação sinérgica da terbinafina e griseofulvina sobre o dano celular desses mesmos isolados de dermatófitos multirresistentes, observando como resultado da combinação de antifúngicos um DC% máximo em torno de 94% para um isolado de *T. mentagrophytes* (TME 16*), com a TBF na concentração de 2.00 µg/mL e GSF 32.00 µg/mL. Desse modo, percebe-se o potencial do C₁₆MImMeS, visto que o mesmo ocasionou um dano em TME 16* de praticamente 82%, na concentração de 0.78 µg/mL, não estando, sinérgica ou aditivamente, vinculado a nenhum outro composto.

5.1.4. Determinação das curvas de morte

No que se refere à cinética de ação fungicida do composto C₁₆MImMeS, as curvas que correlacionam o número de colônias dos isolados dermatofíticos multirresistentes em função do tempo, com o SIM em diferentes concentrações, são apresentadas na figura 37.

Observa-se para o controle sem tratamento do referido teste de tempo de morte fúngica, do inglês “*time kill assay*”, que há um aumento progressivo, com o passar do tempo, do número de colônias das 4 espécies dermatofíticas multirresistentes analisadas (*M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*).

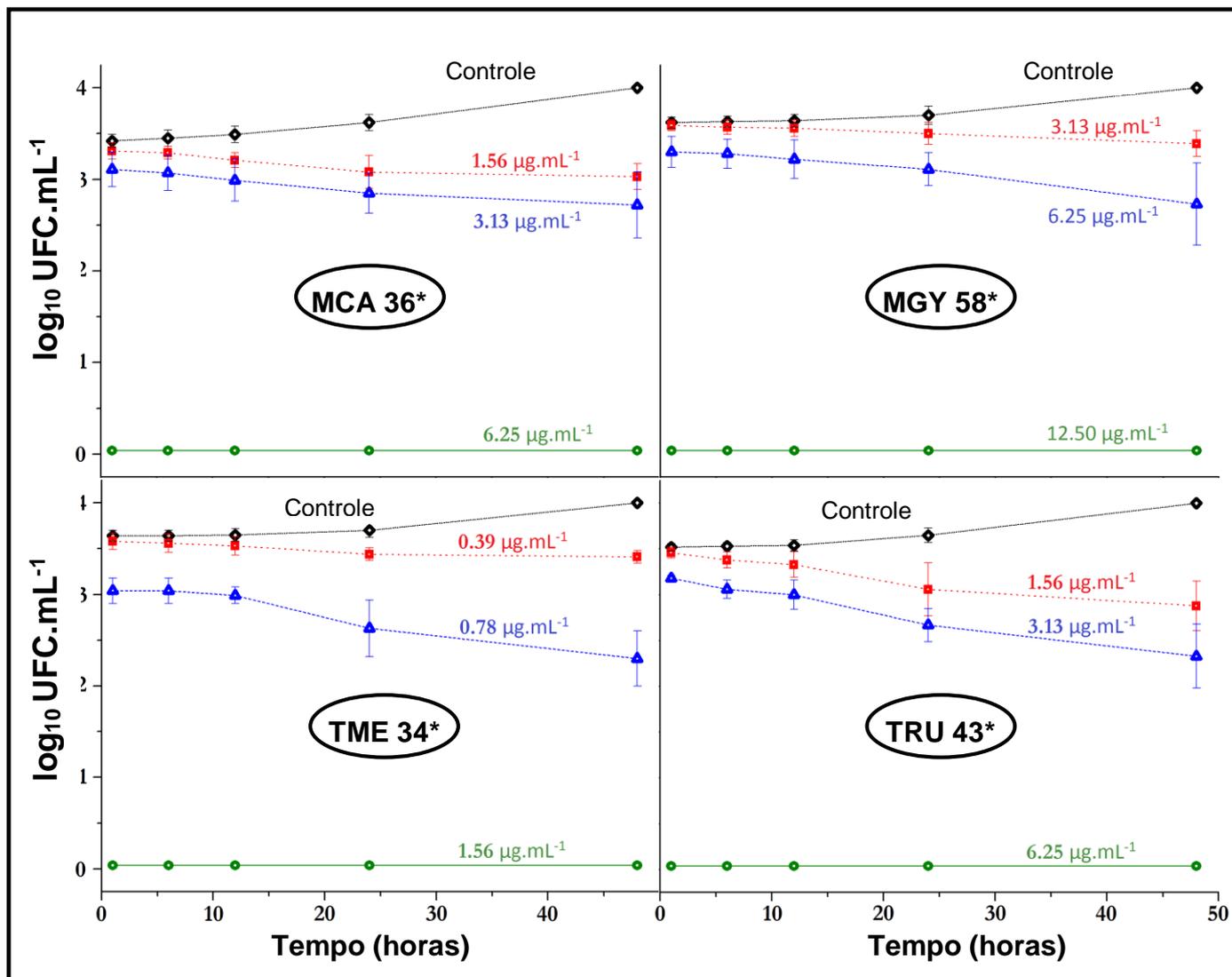


Figura 37. Curvas de morte de 4 dermatófitos multirresistentes – *M. canis* (MCA 36*), *M. gypseum* (MGY 58*), *T. mentagrophytes* (TME 34*) e *T. rubrum* (TRU 25*) baseadas na ação fungicida do C₁₆MImMeS, em três diferentes concentrações correspondentes a CIM, 2xCIM e 4xCIM para cada isolado fúngico, comparado ao controle sem tratamento.

Diferentemente do controle não tratado, para o SIM com 16 carbonos na cadeia lateral e ânion metanossulfonato – C₁₆MImMeS, verifica-se uma diminuição gradual e periódica, no transcorrer das horas, do número de UFC.mL⁻¹, nas concentrações correspondentes à CIM e 2xCIM e total ausência de crescimento fúngico na concentração de 4xCIM, específica para cada isolado – 6.25 µg/mL e 12.50 µg/mL para as espécies de *Microsporum* e 1.56 µg/mL e 6.25 µg/mL para as espécies de *Trichophyton*. Concentrações quatro vezes mais elevadas que o valor da CIM parecem ser um limiar para ação fungicida do C₁₆MImMeS, visto que o

considerado no *time kill* corrobora com a determinação da CFM, em que para esse SIM 4xCIM foi a concentração fungicida para absolutamente todos os dermatófitos.

Em relação ao tempo, após 1 hora de incubação do C₁₆MImMeS com os inóculos fúngicos já se observou uma diminuição considerável no número de colônias, nas duas menores concentrações do composto, em comparação com o controle. Nesse mesmo tempo já é possível a visualização do efeito fortemente fungicida do SIM, na maior concentração – 4xCIM, já que não há crescimento fúngico visível nas placas com ABD. A efetiva ação fungicida foi permanente nas 48 h de avaliação (Fig. 37), como demonstrado nas imagens das placas de petri, utilizadas na contagem de colônias no ensaio, nas figuras 38 e 39, em relação ao tempo inicial de 1 hora e tempo final de 48 horas de análise, respectivamente.

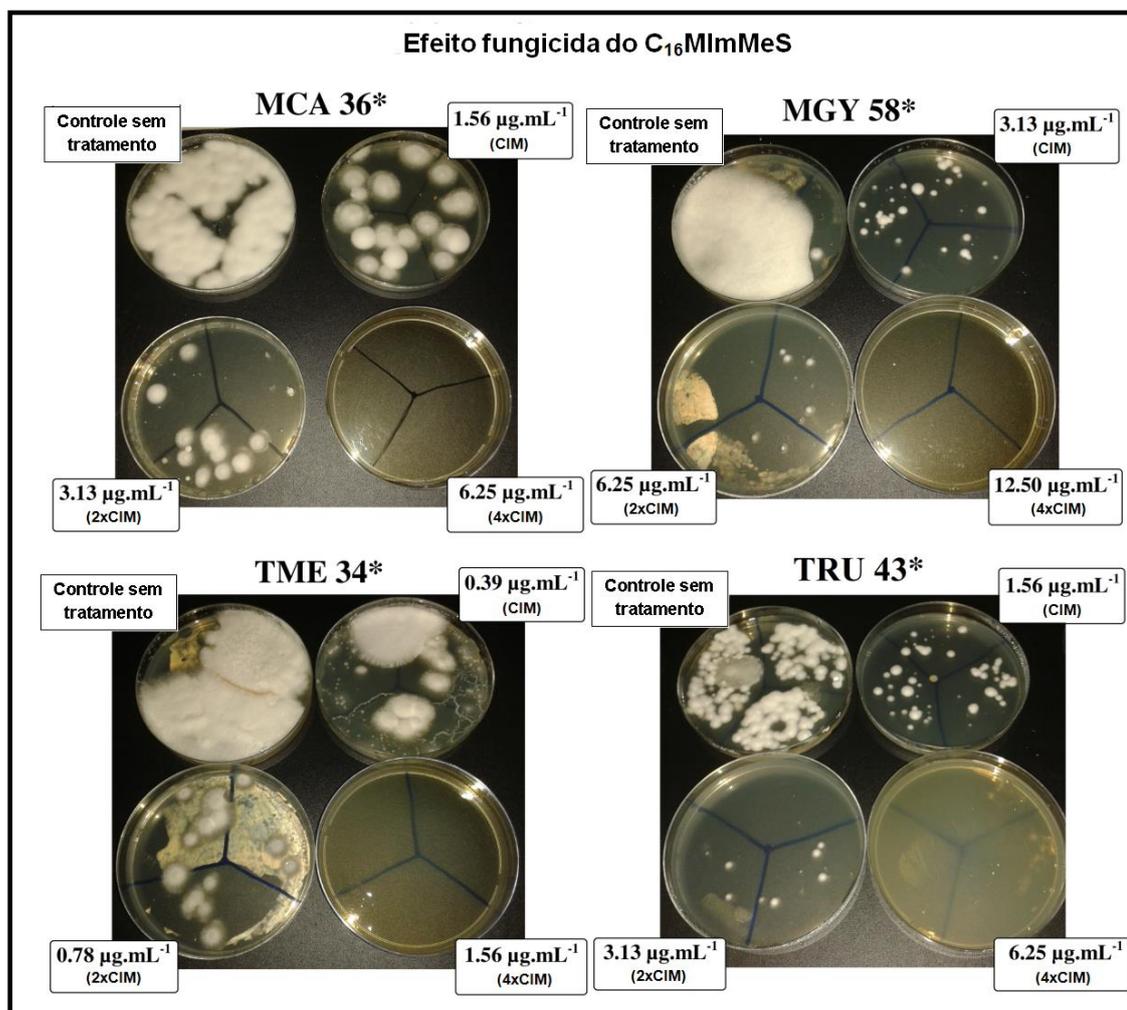


Figura 38. Imagens das placas de petri, na diluição 10⁻², utilizadas para contagem de colônias, na determinação das curvas de morte de *M. canis* (MCA 36*), *M. gypseum* (MGY 58*), *T. mentagrophytes* (TME 34*) e *T. rubrum* (TRU 43*), pós-tratamento *in vitro* com C₁₆MImMeS, no tempo inicial de 1 hora.

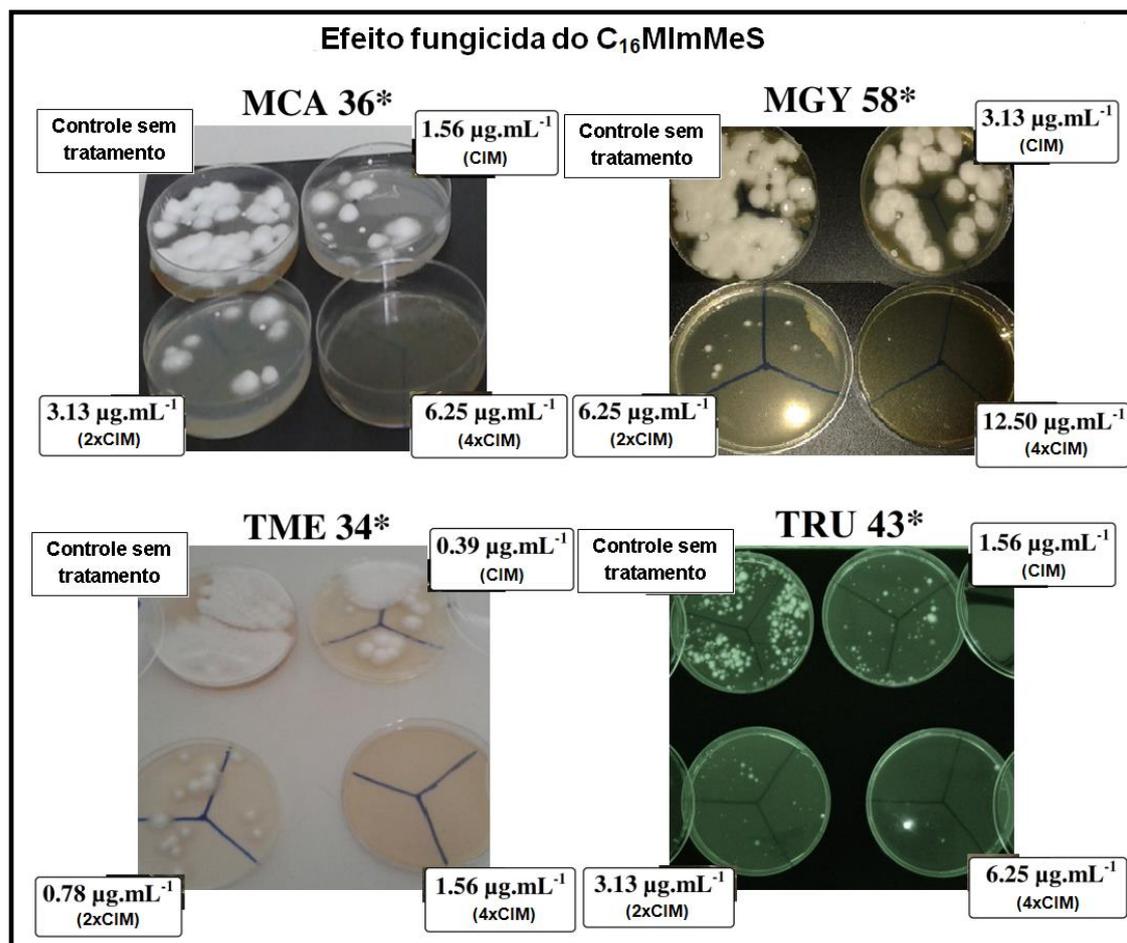


Figura 39. Imagens das placas de petri, na diluição 10^{-2} , utilizadas para contagem de colônias, na determinação das curvas de morte de *M. canis* (MCA 36*), *M. gypseum* (MGY 58*), *T. mentagrophytes* (TME 34*) e *T. rubrum* (TRU 43*), pós-tratamento *in vitro* com C₁₆MImMeS, no tempo final de 48 horas.

Nas duas figuras (38 e 39) fica claramente visível a diminuição gradual do crescimento dermatofítico com o C₁₆MImMeS na CIM e 2xCIM, comparado ao controle sem tratamento, que tem a placa repleta de micélio. Na concentração 4xCIM, não há crescimento de colônias para nenhum dos isolados de *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*.

Na literatura há alguns estudos da cinética de outros compostos com ação fungicida contra dermatófitos (HAMMER; CARSON; RILEY, 2002; MCCARTHY et al., 2009; SIMONETTI et al., 2014). Em 2002, a atividade fungicida *in vitro* do óleo de *Melaleuca alternifolia* foi avaliada em relação à *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*. Os experimentos de *time kill* demonstraram que, em concentrações que variaram de 0.25 a 2.00%, o óleo da espécie vegetal pertencente à família *Myrtaceae* apresentou efeito fungicida após 24 h de contato com os dermatófitos (HAMMER; CARSON; RILEY, 2002). Em 2009, averiguou-se o potencial fungicida, por *time kill assay*, de

uma emulsão contendo cloreto de cetilpiridínio, que é um composto quaternário de amônio catiônico, com estrutura química semelhante a um dos SIMs investigados nesse estudo - o C₁₆MImCl, porém com apenas 1 nitrogênio no anel imidazólico catiônico (MCCARTHY et al., 2009). Em 2 horas essa emulsão, na concentração 4xCIM (16.00 µg/mL), foi capaz de reduzir significativamente o número de colônias de *T. rubrum*, sendo que nenhum dos controles antifúngicos utilizados no ensaio, em concentrações 16 vezes superiores à CIM, como itraconazol (16.00 µg/mL) e terbinafina (4.00 µg/mL), ao longo de 24 horas de análise, reduziram significativamente o crescimento da espécie fúngica, com exceção de ciclopirox (16.00 µg/mL), que começou a exercer seu efeito fungicida em 8 horas (MCCARTHY et al., 2009). No presente trabalho não se determinou o tempo de ação fungicida do C₁₆MImCl porque esse sal não apresentou essa ação, nas concentrações testadas (CIM, 2xCIM e 4xCIM) contra os isolados multirresistentes, porém comparando-se a emulsão de cloreto de cetilpiridínio com o C₁₆MImMeS, em relação a *T. rubrum*, por exemplo, o SIM iniciou sua ação fungicida na metade do tempo (1 h, Fig. 37) relatado para a emulsão (2 h), em uma concentração praticamente 3 vezes menor (6.25 µg/mL, Fig. 37), sendo nesse caso mais efetivo como fungicida, em termos de concentração-tempo de morte.

Em 2014, determinaram-se as curvas de morte de MCA, TME e TRU, após incubação das respectivas espécies dermatofíticas com um peptídeo análogo sintético da protegrina denominado IB-367 (SIMONETTI et al., 2014). Constatou-se que o composto na concentração correspondente à CIM (8.00 µg/mL para *Microsporium* e 16.00 µg/mL para *Trichophyton*) começou a exercer ação fungicida a partir de 2 horas para MCA e TME, mas não foi capaz de diminuir consideravelmente o número de colônias viáveis (≥ 99.99%) de *T. rubrum*, nas primeiras 24 horas de análise do teste, porém começou a apresentar-se fungicida para essa espécie tricofítica em concentrações 2 vezes superiores à CIM e após 24 h. Terbinafina e itraconazol, utilizados como controle positivo, começaram a reduzir significativamente o número de colônias a partir de 2 h, em faixas de concentração de 0.25 a 1.00 µg/mL (SIMONETTI et al., 2014).

5.2. Avaliação dos mecanismos de ação

5.2.1. Análise do efeito sobre a biossíntese do ergosterol

Os dados relativos à quantificação do ergosterol da membrana celular dos sete dermatófitos multirresistentes, em relação aos 3 SIMs e CTZ são apresentados na tabela 12.

Tabela 12. Efeito sobre a biossíntese do ergosterol fúngico de isolados dermatofíticos multirresistentes, pós-tratamento *in vitro* com os SIMs C₁₆MImCl, C₁₆MImMeS, C₁₆MImNTf₂ e antifúngico cetoconazol (CTZ).

Dermatófitos multirresistentes	Sais imidazólicos (CIM)**			Agente antifúngico (CIM)**	Controle sem tratamento
	C ₁₆ MImCl	C ₁₆ MImMeS	C ₁₆ MImNTf ₂	CTZ	
MCA 36*	0.169 ±0.002 (69)	0.162 ±0.003 (70)	0.320 ±0.008 (41)	0.101 ±0.003 (82)	0.546 ±0.003
MCA 40*	0.132 ±0.009 (76)	0.203 ±0.002 (63)	0.359 ±0.005 (35)	0.103 ±0.004 (81)	0.554 ±0.004
MGY 58*	0.176 ±0.006 (65)	0.170 ±0.002 (66)	0.301 ±0.004 (40)	0.102 ±0.003 (80)	0.504 ±0.006
TME 16*	0.146 ±0.005 (72)	0.204 ±0.007 (60)	0.322 ±0.001 (38)	0.108 ±0.001 (79)	0.516 ±0.034
TME 34*	0.180 ±0.004 (66)	0.185 ±0.006 (65)	0.375 ±0.011 (30)	0.110 ±0.007 (79)	0.533 ±0.006
TRU 25*	0.184 ±0.006 (64)	0.199 ±0.015 (61)	0.361 ±0.004 (29)	0.109 ±0.002 (79)	0.508 ±0.003
TRU 43*	0.182 ±0.004 (68)	0.240 ±0.004 (68)	0.357 ±0.004 (38)	0.126 ±0.007 (78)	0.576 ±0.004
Média aritmética	0.167 ±0.005 (69)	0.195 ±0.006 (64)	0.342 ±0.005 (36)	0.108 ±0.004 (80)	0.534 ±0.008
Dermatófitos multirresistentes	Sais imidazólicos (CIM/2)***			Agente antifúngico (CIM/2)***	Controle sem tratamento
	C ₁₆ MImCl	C ₁₆ MImMeS	C ₁₆ MImNTf ₂	CTZ	
MCA 36*	0.214 ±0.001 (61)	0.300 ±0.002 (45)	0.371 ±0.004 (32)	0.204 ±0.005 (63)	0.546 ±0.003
MCA 40*	0.235 ±0.003 (57)	0.299 ±0.002 (46)	0.360 ±0.005 (35)	0.214 ±0.009 (61)	0.554 ±0.004
MGY 58*	0.269 ±0.006 (47)	0.298 ±0.002 (41)	0.317 ±0.009 (37)	0.208 ±0.004 (59)	0.504 ±0.006
TME 16*	0.280 ±0.006 (46)	0.283 ±0.009 (45)	0.366 ±0.009 (29)	0.197 ±0.005 (62)	0.516 ±0.034
TME 34*	0.213 ±0.004 (60)	0.286 ±0.008 (46)	0.389 ±0.022 (27)	0.216 ±0.003 (59)	0.533 ±0.006
TRU 25*	0.234 ±0.006 (54)	0.284 ±0.011 (44)	0.370 ±0.006 (27)	0.208 ±0.002 (59)	0.508 ±0.003
TRU 43*	0.268 ±0.002 (53)	0.285 ±0.003 (50)	0.361 ±0.006 (37)	0.204 ±0.004 (65)	0.576 ±0.004
Média aritmética	0.245 ±0.004 (54)	0.291 ±0.005 (45)	0.362 ±0.009 (32)	0.207 ±0.004 (61)	0.534 ±0.008

*Isolados multirresistentes de *M. canis* (MCA), *M. gypseum* (MGY), *T. mentagrophytes* (TME) e *T. rubrum* (TRU). **Concentração inibitória mínima. ***Concentração sub-inibitória mínima. A média do conteúdo de ergosterol foi expressa como porcentagem em relação ao peso seco da célula ± desvio padrão (seguido em parênteses pela porcentagem aproximada de redução do conteúdo de ergosterol comparado ao controle sem tratamento).

Com base no observado na tabela 12 e relacionando-se os sete isolados multirresistentes, com os dados relativos ao conteúdo de ergosterol das células dermatofíticas, observa-se pós-tratamento *in vitro* com os SIMs, na concentração inibitória mínima, que há uma considerável redução do total de ergosterol, comparado com as células não tratadas. A média dessa redução é de 69% para o C₁₆MImCl, 64% para o C₁₆MImMeS e 36% para o C₁₆MImNTf₂, enquanto que o cetoconazol ocasiona uma redução geral de 80%. Já com os SIMs e antifúngico imidazólico, na concentração sub-inibitória, percebe-se uma menor eficiência dessas substâncias em ocasionar uma redução relevante nos níveis de ergosterol, presente na membrana celular dermatofítica, com uma taxa de redução do esterol de 54% para C₁₆MImCl, 45% para C₁₆MImMeS, 32% para C₁₆MImNTf₂ e 61% para o CTZ. Isso estabelece a importância da concentração na performance de ação antifúngica das substâncias avaliadas. Os dois compostos que mais se aproximaram do cetoconazol, relativamente ao potencial de redução do teor de ergosterol, são os sais com ânion cloreto e metanossulfonato, sendo que o C₁₆MImNTf₂, comparado aos demais SIMs, exibiu uma fraca capacidade de diminuir a síntese do principal esterol fúngico, inclusive na CIM, o que foi também constatado estatisticamente na tabela 13.

Tabela 13. Análise estatística do efeito sobre a biossíntese de ergosterol fúngico, para comparação entre C₁₆MImCl, C₁₆MImMeS, C₁₆MImNTf₂, cetoconazol e o controle não tratado.

CIM	Ergosterol na célula Mediana [25%; 75%]	CIM/2	Ergosterol na célula Mediana [25%; 75%]	p-valor
Sem tratamento	0.533 ^a [0.508; 0.554]	Sem tratamento	0.533 ^a [0.508; 0.554]	-
C₁₆MImNTf₂	0.357 ^{ac} [0.320; 0.361]	C₁₆MImNTf₂	0.361 ^{ac} [0.339; 0.370]	0.307
C₁₆MImMeS	0.199 ^{abc} [0.170; 0.204]	C₁₆MImMeS	0.286 ^{abc} [0.284; 0.299]	0.002[#]
C₁₆MImCl	0.176 ^{bc} [0.146; 0.182]	C₁₆MImCl	0.235 ^{bc} [0.215; 0.269]	0.002[#]
Cetoconazol	0.108 ^b [0.102; 0.110]	Cetoconazol	0.208 ^b [0.204; 0.214]	0.002[#]
p-valor	<0.05*	p-valor	<0.05*	

[#]Diferença significativa no teste de Mann-Whitney. *Diferença significativa no teste de Kruskal-Wallis, onde medianas seguidas de mesma letra não diferem entre si.

A partir da consideração do p-valor da coluna (Tab. 13) referente ao tratamento com as substâncias na CIM x CIM/2, somente o C₁₆MImNTf₂ não apresentou diferença significativa na redução de ergosterol (p>0.05), quanto à utilização do mesmo nas duas distintas concentrações avaliadas. Os outros dois

SIMs - C₁₆MImCl e C₁₆MImMeS e o cetoconazol apresentaram diferenças significativas quando utilizados na CIM ou em concentrações duas vezes inferiores a essa, onde a porcentagem de ergosterol é de modo significativo maior nas concentrações sub-inibitórias. Portanto, a redução da totalidade de ergosterol fúngico é substancialmente mais efetiva, como já esperado, quando se utiliza os mesmos nas concentrações correspondentes à CIM. Tanto na análise da CIM como da CIM/2, os resultados de similaridade entre os compostos foram iguais: C₁₆MImCl, C₁₆MImMeS e CTZ foram equivalentes quanto à competência de interferir na biossíntese de ergosterol, ocasionando um decréscimo nos seus níveis celulares.

Com a depleção do ergosterol, a integridade da membrana celular fúngica fica comprometida, já que a presença do esteroide é essencial para a manutenção e estabilidade das funções da membrana e, portanto, fundamental para o desenvolvimento e sobrevivência dos fungos. Substâncias que bloqueiam a síntese desse esteroide formam uma das linhas terapêuticas mais eficazes, como os antifúngicos azólicos, nesse estudo representados pelo cetoconazol, utilizado como composto referência de redução do ergosterol citoplasmático, por inibir, como já mencionado, uma das enzimas-chave da via final de biossíntese do mesmo (MOOSSAVI; BAGHERI; SCHER, 2001; ODSS; BROWN; GOW, 2003; HAMDAN; HAHN, 2006). Os SIMs investigados nesse ensaio de quantificação do ergosterol, especialmente C₁₆MImCl e C₁₆MImMeS, reduziram de forma significativa a concentração de ergosterol associado à membrana, tal como o CTZ, porém o mecanismo específico pelo qual esses SIMs estão conseguindo fazer isso necessita pesquisas mais detalhadas, que envolvam ensaios enzimáticos específicos, visto que não se sabe ao certo qual enzima da rota de síntese celular do esteroide está envolvida no caso de ação dos sais. Desse modo, há possibilidade de inibição da 14- α -demetilase, seguindo modelo de ação do CTZ, mas também há possibilidades de inibição de outras enzimas.

A investigação de outros compostos, quanto à ação de interferência na biossíntese de ergosterol de dermatófitos é relatada na literatura. O conteúdo de ergosterol de uma cepa de *T. rubrum* mutante foi quantificado espectrofotometricamente, pós-tratamento *in vitro* com os flavonoides quercetina, cerulenina e trans-chalcona. Relatou-se para a quercetina (CIM = 63.00 $\mu\text{g/mL}$) uma porcentagem de redução do ergosterol de mais de 56%, para cerulenina (CIM =

63.00 µg/mL) aproximadamente 50%, para trans-chalcona na CIM = 1.90 µg/mL 100% e trans-chalcona na CIM/2 = 0.95 µg/mL cerca de 78% (BITENCOURT et al., 2013). Em uma concentração semelhante (1.56 µg/mL, Tab. 5) C₁₆MImMeS, por exemplo, ocasionou 61 a 68% de diminuição do ergosterol. Em 2013, publicaram-se dados da inibição da biossíntese de ergosterol por alguns derivados triazólicos, relatando-se uma redução do esterol, para um dos compostos na concentração de 2.00 µg/mL, de até 89% para *E. floccosum*, sendo que a terbinafina, utilizada no estudo como fármaco controle, apresentou um valor de diminuição do teor de ergosterol de até 80%, em uma concentração de 2.00 µg/mL (OUF et al., 2013).

5.2.2. Análise do efeito de complexação com ergosterol exógeno

As concentrações inibitórias mínimas dos SIMs C₁₆MImCl, C₁₆MImMeS, C₁₆MImNTf₂ e antifúngico referência anfotericina B, na presença de ergosterol exógeno são apresentadas na tabela 14. Nessa avaliação experimental, objetivou-se averiguar se os SIMs além de ocasionarem redução da concentração de ergosterol fúngico eram capazes de complexarem-se com o mesmo. Apesar da anfotericina B não ser muito comumente utilizada, na prática clínica, no tratamento das dermatofitoses, foi empregada nesse ensaio por ser a substância padrão de pronunciada afinidade e efeito complexador com o esterol das espécies fúngicas em geral (GONÇALVES, 2011).

Pela análise da tabela, em relação ao aumento ou não da CIM na presença de ergosterol, em diferentes concentrações (50.00 a 200.00 µg/mL), dissolvido no meio de cultura utilizado no ensaio, observa-se para AFB, em uma leitura da microplaca em 4 dias, que a CIM aumentou 2 vezes na presença de ergosterol 50.00 µg/mL, permanecendo o mesmo valor (4.00 µg/mL), nas concentrações superiores de ergosterol. Com 7 dias de incubação das microplacas, o efeito progressivo de aumento da CIM teve relação direta com a crescente concentração de ergosterol comercial adicionado, visto que a CIM da AFB, comparada com a CIM sem acréscimo de ergosterol, dobra com ergosterol 50.00 µg/mL e aumenta 4, 8 e 16 vezes com o esterol 100.00 µg/mL, 150.00 µg/mL e 200 µg/mL, respectivamente. Logo, uma determinação da CIM após 7 dias, no caso desse tipo de análise, parece ser mais precisa, para uma visualização mais clara das modificações que ocorrem.

Tabela 14. Valores de CIM, em µg/mL, do C₁₆MImCl, C₁₆MImMeS, C₁₆MImNTf₂ e da anfotericina B (AFB), sem e com adição de ergosterol comercial.

	C ₁₆ MImCl	Leitura das microplacas em 4 dias					Leitura das microplacas em 7 dias				
		CIM ¹	CIM ²	CIM ³	CIM ⁴	CIM ⁵	CIM ¹	CIM ²	CIM ³	CIM ⁴	CIM ⁵
Isolados multirresistentes	MCA 36*	3.13	6.25	6.25	6.25	6.25	3.13	6.25	12.50	12.50	25.00
	MCA 40*	0.05	0.10	0.10	0.10	0.10	0.05	0.10	0.20	0.20	0.40
	MGY 58*	6.25	12.50	12.50	12.50	12.50	6.25	12.50	25.00	25.00	50.00
	TME 16*	1.56	3.13	3.13	3.13	3.13	1.56	3.13	6.25	6.25	12.50
	TME 34*	12.50	25.00	25.00	25.00	25.00	12.50	25.00	50.00	50.00	100.00
	TRU 25*	12.50	25.00	25.00	25.00	25.00	12.50	25.00	50.00	50.00	100.00
	TRU 43*	12.50	25.00	25.00	25.00	25.00	12.50	25.00	50.00	50.00	100.00
	C ₁₆ MImMeS	Leitura das microplacas em 4 dias					Leitura das microplacas em 7 dias				
		CIM ¹	CIM ²	CIM ³	CIM ⁴	CIM ⁵	CIM ¹	CIM ²	CIM ³	CIM ⁴	CIM ⁵
Isolados multirresistentes	MCA 36*	1.56	3.13	3.13	3.13	3.13	1.56	3.13	6.25	6.25	12.50
	MCA 40*	0.05	0.10	0.10	0.10	0.10	0.05	0.10	0.20	0.20	0.39
	MGY 58*	3.13	6.25	6.25	6.25	6.25	3.13	6.25	12.50	12.50	25.00
	TME 16*	0.78	1.56	1.56	1.56	1.56	0.78	1.56	3.13	3.13	6.25
	TME 34*	0.39	0.78	0.78	0.78	0.78	0.39	0.78	1.56	1.56	3.13
	TRU 25*	1.56	3.13	3.13	3.13	3.13	1.56	3.13	6.25	6.25	12.50
	TRU 43*	1.56	3.13	3.13	3.13	3.13	1.56	3.13	3.13	3.13	12.50
	C ₁₆ MImNTf ₂	Leitura das microplacas em 4 dias					Leitura das microplacas em 7 dias				
		CIM ¹	CIM ²	CIM ³	CIM ⁴	CIM ⁵	CIM ¹	CIM ²	CIM ³	CIM ⁴	CIM ⁵
Isolados multirresistentes	MCA 36*	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	12.50	12.50	12.50	12.50
	MCA 40*	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	3.13	3.13	3.13	3.13
	MGY 58*	12.50	12.50	12.50	12.50	12.50	12.50	25.00	25.00	25.00	25.00
	TME 16*	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	6.25	6.25	6.25	6.25
	TME 34*	12.50	12.50	12.50	12.50	12.50	12.50	25.00	25.00	25.00	25.00
	TRU 25*	12.50	12.50	12.50	12.50	12.50	12.50	25.00	25.00	25.00	25.00
	TRU 43*	12.50	12.50	12.50	12.50	12.50	12.50	25.00	25.00	25.00	25.00
	AFB	Leitura das microplacas em 4 dias					Leitura das microplacas em 7 dias				
		CIM ¹	CIM ²	CIM ³	CIM ⁴	CIM ⁵	CIM ¹	CIM ²	CIM ³	CIM ⁴	CIM ⁵
Isolados multirresistentes	MCA 36*	2.00	4.00	4.00	4.00	4.00	2.00	4.00	8.00	16.00	32.00
	MCA 40*	2.00	4.00	4.00	4.00	4.00	2.00	4.00	8.00	16.00	32.00
	MGY 58*	2.00	4.00	4.00	4.00	4.00	2.00	4.00	8.00	16.00	32.00
	TME 16*	1.00	2.00	2.00	2.00	2.00	1.00	2.00	4.00	8.00	16.00
	TME 34*	2.00	4.00	4.00	4.00	4.00	2.00	4.00	8.00	16.00	32.00
	TRU 25*	2.00	4.00	4.00	4.00	4.00	2.00	4.00	8.00	16.00	32.00
	TRU 43*	2.00	4.00	4.00	4.00	4.00	2.00	4.00	8.00	16.00	32.00

*Isolados multirresistentes de *M. canis* (MCA), *M. gypseum* (MGY), *T. mentagrophytes* (TME) e *T. rubrum* (TRU). CIM¹ corresponde a CIM sem adição de ergosterol comercial; CIM², CIM³, CIM⁴ e CIM⁵, correspondem a CIM com adição de ergosterol na concentração de 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL e 200 µg/mL, respectivamente.

Logo, fundamentando-se nas concentrações evidenciadas na tabela 14, o comportamento geral de aumento ou não da CIM, na presença de ergosterol comercial em diferentes concentrações, para os 3 SIMs e AFB, é demonstrado na figura 40, considerando a leitura da CIM em 7 dias.

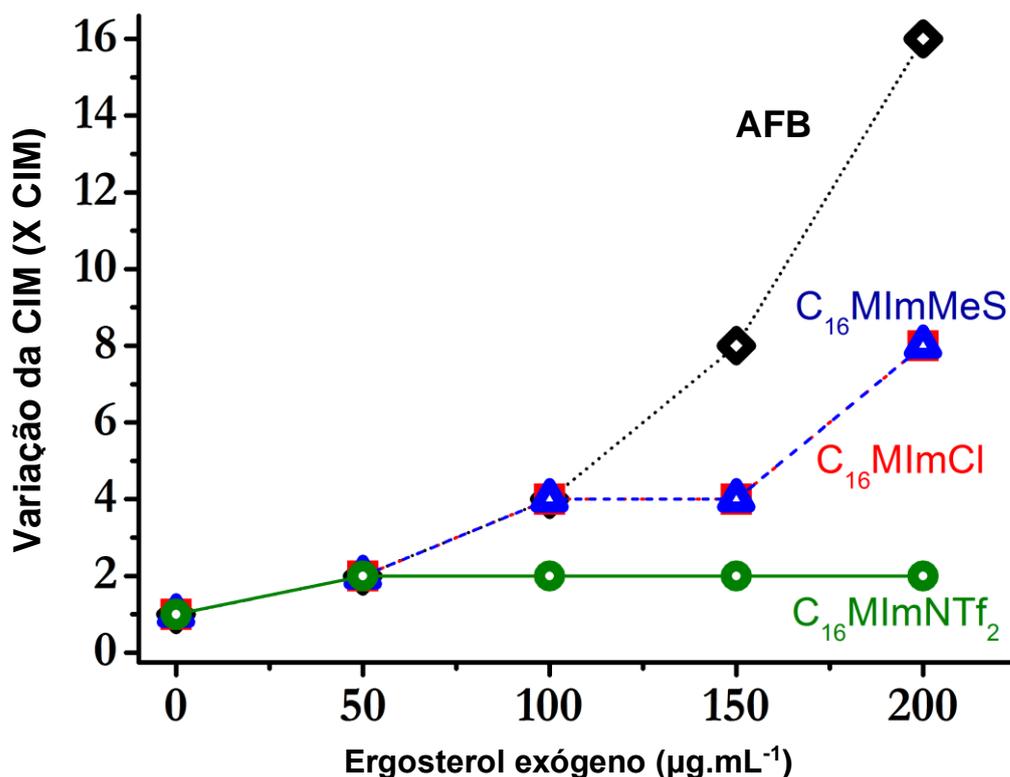


Figura 40. Variação nas CIM's de C₁₆MImCl, C₁₆MImMeS, C₁₆MImNTf₂ e da anfotericina B (AFB), na presença de ergosterol exógeno, em relação a isolados multirresistentes de *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*.

A partir do gráfico, fica bem definido que os dois SIMs C₁₆MImCl e C₁₆MImMeS foram os que exibiram comportamento mais semelhante à AFB. Observa-se gradativa elevação dos valores de CIM, com o aumento periódico da concentração do esterol exógeno. Constata-se para esses dois sais um aumento máximo de CIM de 8 vezes e para AFB, como já mencionado, um aumento de até 16 vezes. Para C₁₆MImNTf₂ a CIM aumenta apenas 2 vezes na presença de ergosterol, independentemente da concentração do mesmo, o que denota uma fraca capacidade desse composto de ligação e complexação com esse esterol.

Nesse ensaio consegue-se qualitativamente inferir sobre a afinidade de uma substância pelo ergosterol do fungo, de modo que se determinada molécula possui

atividade antifúngica ligando-se ao esterol da membrana celular, mediante adição de ergosterol comercial, o composto de certa forma dá preferência ao esterol que está livremente sendo fornecido e poupa o ergosterol próprio da espécie fúngica, com isso a CIM tende a aumentar, visto que sua ação não está mais efetivamente sendo executada contra o fungo. Por conseguinte, o aumento da CIM considerável e comparável a AFB identificado para os sais com ânion cloreto e metanossulfonato pode representar um indício de que esses compostos interagem com e inibem o ergosterol, levando-se em conta também nesse caso o ensaio de quantificação do esterol, sendo que para o sal com ânion N-triflato há nesse sentido uma capacidade moderadamente mais fraca de complexação e redução do mesmo.

5.2.3. Análise do efeito sobre a parede celular fúngica

Os dados de análise da interação dos SIMs com a parede celular dermatofítica são apresentados na tabela 15, em referência à CIM dos compostos investigados e antifúngico controle positivo do teste – anidulafungina. O ensaio foi conduzido na presença e ausência de sorbitol, com leitura das microplacas do teste de suscetibilidade em diferentes tempos (dias). Igualmente à anfotericina B supracitada, a anidulafungina não é um dos antifúngicos mais utilizados nos casos de infecção dermatofítica, porém foi selecionada para esse ensaio por tratar-se do principal composto que apresenta ação especificamente na parede celular fúngica (ODSS; BROWN; GOW, 2003; MORRIS; VILLMANN, 2006).

Para ANF, com uma leitura da microplaca em 4 dias, consta-se que a CEM dobra na presença de sorbitol e em 7 dias há aumento de 16 vezes com uma CEM máxima de até 32.00 µg/mL (Tab. 15), para alguns dos sete isolados multirresistentes. De modo semelhante ao observado para o ensaio do efeito de complexação com o ergosterol, nesse experimento a leitura realizada após um maior tempo de incubação permite uma melhor compreensão da mudança dos valores de CIM ou CEM. Para C₁₆MImCl e C₁₆MImNTf₂ não houve alterações das CIM's na presença de sorbitol, nem em 4 e nem em 7 dias. Com C₁₆MImMeS, tal como para ANF, inicialmente a CIM dobrou e posteriormente, após uma semana, aumentou 8 vezes, com um máximo de concentração do SIM de 25.00 µg/mL para *M. gypseum*.

Tabela 15. Valores de CIM do C₁₆MImCl, C₁₆MImMeS, C₁₆MImNTf₂ e da anidulafungina (ANF), em µg/mL, sem e com adição de sorbitol.

Dermatófitos multirresistentes	C ₁₆ MImCl				C ₁₆ MImMeS			
	4 dias		7 dias		4 dias		7 dias	
	CIM ¹	CIM ²	CIM ¹	CIM ²	CIM ¹	CIM ²	CIM ¹	CIM ²
MCA 36*	3.13	3.13	3.13	3.13	1.56	3.13	1.56	12.50
MCA 40*	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.10	0.05	0.39
MGY 58*	6.25	6.25	6.25	6.25	3.13	6.25	3.13	25.00
TME 16*	1.56	1.56	1.56	1.56	0.78	1.56	0.78	6.25
TME 34*	12.50	12.50	12.50	12.50	0.39	0.78	0.39	3.13
TRU 25*	12.50	12.50	12.50	12.50	1.56	3.13	1.56	12.50
TRU 43*	12.50	12.50	12.50	12.50	1.56	3.13	1.56	12.50

Dermatófitos multirresistentes	C ₁₆ MImNTf ₂				Anidulafungina			
	4 dias		7 dias		4 dias		7 dias	
	CIM ¹	CIM ²	CIM ¹	CIM ²	CEM ¹	CEM ²	CEM ¹	CEM ²
MCA 36*	6.25	6.25	6.25	6.25	2.00	4.00	2.00	32.00
MCA 40*	1.56	1.56	1.56	1.56	1.00	2.00	1.00	16.00
MGY 58*	12.50	12.50	12.50	12.50	2.00	4.00	2.00	32.00
TME 16*	3.13	3.13	3.13	3.13	1.00	2.00	1.00	16.00
TME 34*	12.50	12.50	12.50	12.50	1.00	2.00	1.00	16.00
TRU 25*	12.50	12.50	12.50	12.50	2.00	4.00	2.00	32.00
TRU 43*	12.50	12.50	12.50	12.50	2.00	4.00	2.00	32.00

*Isolados multirresistentes de *M. canis* (MCA), *M. gypseum* (MGY), *T. mentagrophytes* (TME) e *T. rubrum* (TRU). CIM¹ corresponde a CIM sem adição de sorbitol; CIM² corresponde a CIM com adição de sorbitol na concentração de 0.8 mol.L⁻¹. CEM¹ corresponde a CEM sem adição de sorbitol; CEM² corresponde a CEM com adição de sorbitol na concentração de 0.8 mol.L⁻¹. Leitura em 4 e 7 dias.

A elevação ou não dos valores de CIM, na presença de sorbitol 0.8 M, para os 3 SIMs e ANF, é demonstrado na figura 41, com base na tabela 15. Analisando-se a imagem gráfica percebe-se que o comportamento de variação da CIM do C₁₆MImMeS é realmente o mais próximo do antifúngico controle, o que sugere que esse composto esteja agindo também a nível de parede celular, de modo mais considerável que C₁₆MImCl e C₁₆MImMeS. Essa poderia ser uma das razões de diferenciação desse sal com ânion metanossulfonato em relação à potencialidade de ação fungicida do mesmo. O C₁₆MImMeS, como já bem mencionado, foi o único sal imidazólico que matou absolutamente todos os 45 isolados clínicos dermatofíticos analisados, inclusive os 7 multirresistentes (Tab. 10 e 11). A ANF age inibindo seletivamente a enzima 1,3-β-D glucana sintase, impedindo assim a formação da

1,3- β -D-glucana, um componente essencial da estrutura da parede celular. Adicionalmente aos inibidores da síntese da glucana (como a ANF), há ainda a possibilidade de inibição da quitina, um importante componente da parede celular fúngica, responsável pela forma da mesma, sendo que inibidores da síntese da quitina representam um atrativo alvo de pesquisa de novos agentes antifúngicos (KATHIRAVAN et al., 2012), porém os mecanismos específicos, a nível enzimático ou não, pelos quais C_{16} MImMeS estaria agindo na parede dos dermatófitos ainda precisam ser mais detalhadamente esclarecidos. Além do mais, não se descarta uma possível interação química, entre os compostos imidazólicos e o próprio sorbitol, sendo que isso também necessita futuras análises.

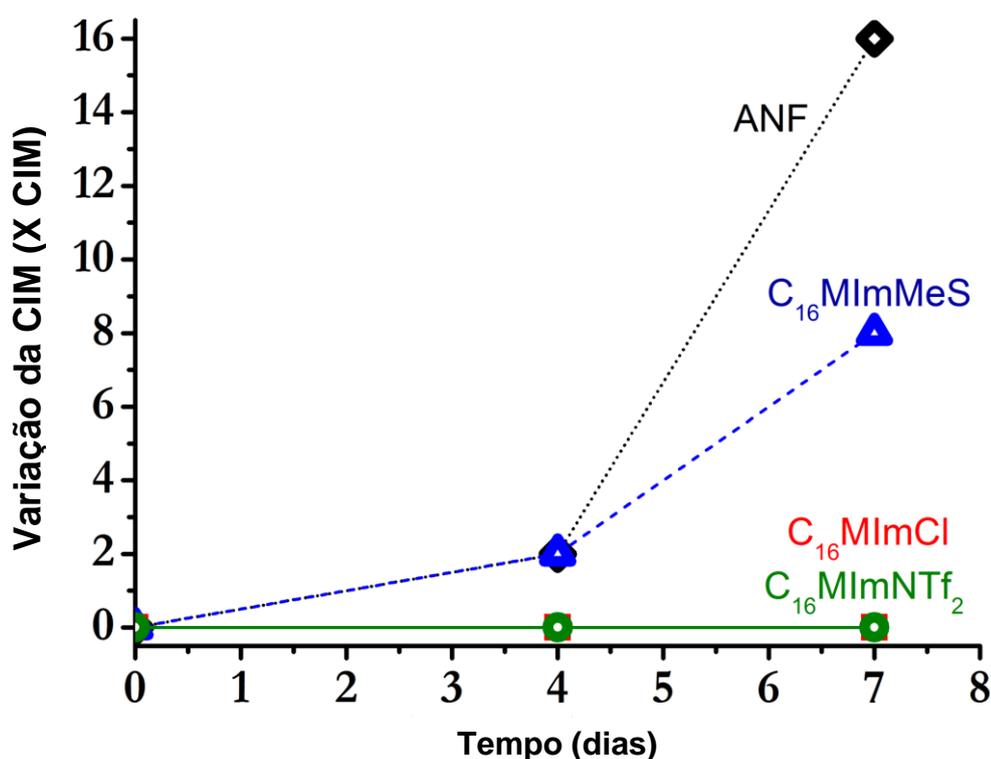


Figura 41. Variação nas CIM's de C_{16} MImCl, C_{16} MImMeS, C_{16} MImNTf₂ e da anidulafungina (ANF), na presença de sorbitol, em relação a isolados multirresistentes de *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*.

Por fim, o que evidentemente presumi-se, com esse ensaio de análise do efeito sobre a parede, é que C_{16} MImMeS tem sua atividade antidermatofítica revertida (piorada) na presença do sorbitol, que sabidamente é um protetor osmótico da parede celular (FROST et al., 1995).

5.2.4. Análise do efeito de lise celular

As taxas de lise celular dermatofítica, ocasionada pelos SIMs, foram expressas em percentagem no gráfico da figura 42, em comparação com o composto controle positivo de lise SDS, na concentração de 2%.

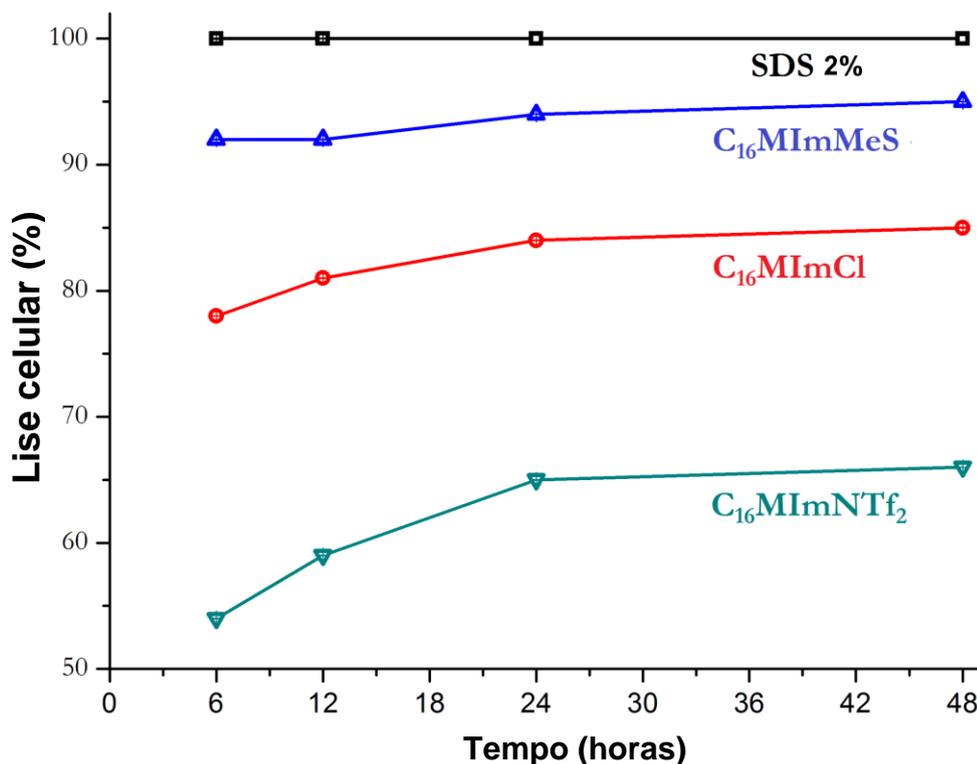


Figura 42. Percentagem de lise celular de isolados multirresistentes de *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*, pós-tratamento *in vitro* com C₁₆MImCl, C₁₆MImMeS, C₁₆MImNTf₂ e SDS 2%.

C₁₆MImMeS em concordância com os outros ensaios já discutidos, foi o SIM que mais efetivamente assemelhou-se ao composto referência, nesse caso o surfactante dodecil sulfato de sódio. As percentagens de lise para o referido SIM, em todos os tempos (6 h, 12 h, 24 h e 48 h) e para os sete dermatófitos multirresistentes, foram maiores que 90%; para C₁₆MImCl maiores que 75% e para C₁₆MImNTf₂ ≥ 55%. Desse modo, os três SIMs foram capazes de ocasionar lise celular dermatofítica. Quanto à investigação estatística de semelhança dos SIMs e SDS, dados apontados na tabela 16, com base na mediana das absorbâncias, observa-se que somente o C₁₆MImMeS foi estatisticamente equivalente ao SDS em

provocar lise das células. O processo de lise provocado de modo mais relevante pelo C₁₆MImMeS também poderia estar contribuindo para ação mais amplamente fungicida desse sal imidazólico, em conjunto com sua também ação exclusiva na parede celular fúngica, ação essa somente constatada para esse sal. Os mecanismos pelos quais se dá a lise, com geralmente extravasamento do conteúdo intracelular essencial para sobrevivência fúngica, ainda não foram evidenciados, sendo que há inúmeras possibilidades para que isso ocorra, como desestabilização osmótica e interações com enzimas da parede e membrana celular das espécies.

Tabela 16. Análise estatística de comparação dos SIMs C₁₆MImCl, C₁₆MImMeS e C₁₆MImNTf₂ com o Dodecilsulfato de sódio (SDS) 2%, em diferentes tempos.

6 horas		12 horas	
Mediana [25%; 75%]		Mediana [25%; 75%]	
SDS 2%	0.84 ^a [0.78; 0.87]	SDS 2%	0.93 ^a [0.88; 0.97]
C ₁₆ MImMeS	0.77 ^{ab} [0.74; 0.78]	C ₁₆ MImMeS	0.85 ^{ab} [0.84; 0.87]
C ₁₆ MImCl	0.64 ^{bc} [0.61; 0.67]	C ₁₆ MImCl	0.75 ^{bc} [0.73; 0.77]
C ₁₆ MImNTf ₂	0.45 ^c [0.44; 0.46]	C ₁₆ MImNTf ₂	0.55 ^c [0.53; 0.56]
p-valor	<0,05*	p-valor	<0,05*
24 horas		48 horas	
Mediana [25%; 75%]		Mediana [25%; 75%]	
SDS 2%	1.47 ^a [1.33; 1.50]	SDS 2%	1.70 ^a [1.50; 1.77]
C ₁₆ MImMeS	0.94 ^{ab} [0.93; 0.94]	C ₁₆ MImMeS	0.95 ^{ab} [0.94; 0.96]
C ₁₆ MImCl	0.84 ^{bc} [0.81; 0.85]	C ₁₆ MImCl	0.85 ^{bc} [0.84; 0.86]
C ₁₆ MImNTf ₂	0.66 ^c [0.64; 0.66]	C ₁₆ MImNTf ₂	0.67 ^c [0.65; 0.68]
p-valor	<0,05*	p-valor	<0,05*

*Diferença significativa no teste de Kruskal-Wallis, onde medianas seguidas pela mesma letra não diferem entre si.

Os resultados de um estudo de atividade antidermatofítica do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* (citronela) mostraram que o óleo na concentração de 78.00 µg/mL provocou 100% de lise celular, em 4 h de interação com *T. mentagrophytes* (PEREIRA et al., 2011). Os autores comentaram que a presença de monoterpenos na constituição química do óleo essencial da citronela confere a importante característica de intensificação da hidrofobicidade do mesmo. Consequente a isso, é provável uma maior interação com a membrana fúngica, interferindo na sua integridade e levando a lise, dano irreversível para os

dermatófitos. Contrastando-se nesse caso a concentração do óleo testado (78.00 $\mu\text{g/mL}$) com a dos SIMs, para os isolados multirresistentes de *T. mentagrophytes*, $\text{C}_{16}\text{MImMeS}$, por exemplo, ocasiona níveis de dano maiores que 90% em uma concentração de 0.39 $\mu\text{g/mL}$ para TME 34* e 0.78 $\mu\text{g/mL}$ para TME 16*, ou seja, concentrações até 100 vezes menores que a relatada para o óleo de citronela.

5.3. Relação dos mecanismos antidermatofíticos observados

Fazendo-se uma retrospectiva mais geral, relacionando-se os mecanismos, com base no observado experimentalmente, em decorrência da pesquisa das prováveis vias mecânicas de ação antifúngica dos SIMs - $\text{C}_{16}\text{MImCl}$, $\text{C}_{16}\text{MImMeS}$ e $\text{C}_{16}\text{MImNTf}_2$ constata-se um potencial de dano às células mais acentuado para $\text{C}_{16}\text{MImCl}$ e $\text{C}_{16}\text{MImMeS}$, como demonstrado na figura 4.

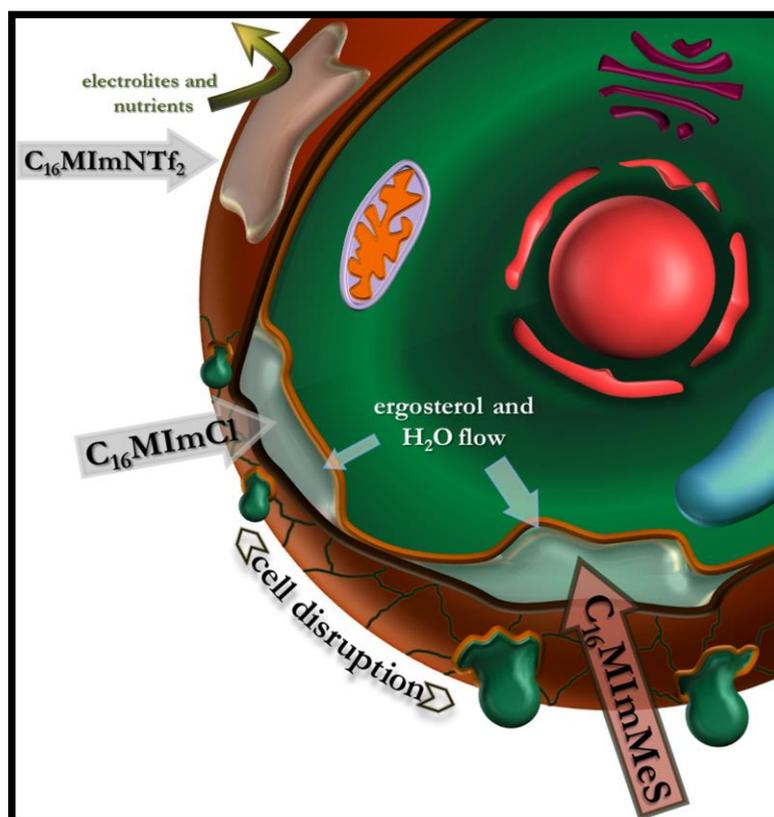


Figura 43. Imagem representativa dos mecanismos de ação dos SIMs $\text{C}_{16}\text{MImCl}$, $\text{C}_{16}\text{MImMeS}$ e $\text{C}_{16}\text{MImNTf}_2$.

Relativamente ao estudo do efeito dos sais imidazólicos sobre a biossíntese de ergosterol, os três SIMs ($\text{C}_{16}\text{MImCl}$ e $\text{C}_{16}\text{MImMeS}$ e $\text{C}_{16}\text{MImNTf}_2$) reduziram o

conteúdo de ergosterol, porém apenas $C_{16}MImCl$ e $C_{16}MImMeS$ foram estatisticamente equivalentes ao cetoconazol na eficiência de depleção do principal esterol da membrana celular dermatofítica. Na análise da interação desses compostos com o ergosterol, $C_{16}MImCl$ e $C_{16}MImMeS$ apresentaram uma capacidade de complexação com o mesmo comparável à anfotericina B, sendo que para $C_{16}MImNTf_2$ constatou-se uma fraca habilidade de ligação a esse esterol. No referente à investigação sobre a parede celular fúngica, não houve indícios de uma principal ação por essa via para os SIMs $C_{16}MImCl$ e $C_{16}MImNTf_2$, porém $C_{16}MImMeS$ demonstrou efeito sobre a parede comparável à anidulafungina. Sugere-se esse mecanismo como o diferencial que conduz ao forte potencial fungicida desse composto com ânion metanossulfonato. Além disso, os 3 SIMs promoveram lise celular nos dermatófitos multirresistentes, sendo que $C_{16}MImCl$ e $C_{16}MImMeS$ foram os que determinaram as maiores taxas de disruptura fúngica. $C_{16}MImMeS$ foi capaz de lisar quase que totalmente às células das espécies analisadas (lise $\geq 90\%$).

Desse modo, na figura 43, destaca-se ilustrativamente a maior capacidade de dano às células por $C_{16}MImCl$ e especialmente por $C_{16}MImMeS$. Verificou-se experimentalmente que os SIMs atuam contra os dermatófitos por interagirem com a membrana ($C_{16}MImCl$, $C_{16}MImMeS$ e $C_{16}MImNTf_2$) e parede celular ($C_{16}MImMeS$) desses fungos, ocasionando danos consideravelmente irreversíveis, confirmados pela ação fungicida do sal com ânion cloreto sobre os isolados mais sensíveis e do sal com ânion metanossulfonato sobre isolados sensíveis e multirresistentes. Sugere-se que $C_{16}MImNTf_2$ por ter o ânion N-triflato mais volumoso que o ânion dos outros dois sais considerados, poderia ter uma maior dificuldade de interação e interiorização nas células fúngicas. Ademais poderia estar ocorrendo um desequilíbrio eletrostático entre cátion e ânion mais intenso para esse sal que para os demais, mas certamente necessita-se de mais estudos para um entendimento completo do comportamento desses compostos imidazólicos iônicos nas células fúngicas, dentro e fora das mesmas.

Por fim, um desenho inédito feito pelo designer gráfico Leonardo Amora Leite particularmente para esse trabalho é apresentado na figura 44. Amora Leite conseguiu retratar, de maneira bem-humorada, a efetividade antifúngica dos sais imidazólicos contra os dermatófitos, em comparação com os antifúngicos comerciais, com os quais na prática, às vezes, observam-se casos de resistência fúngica.

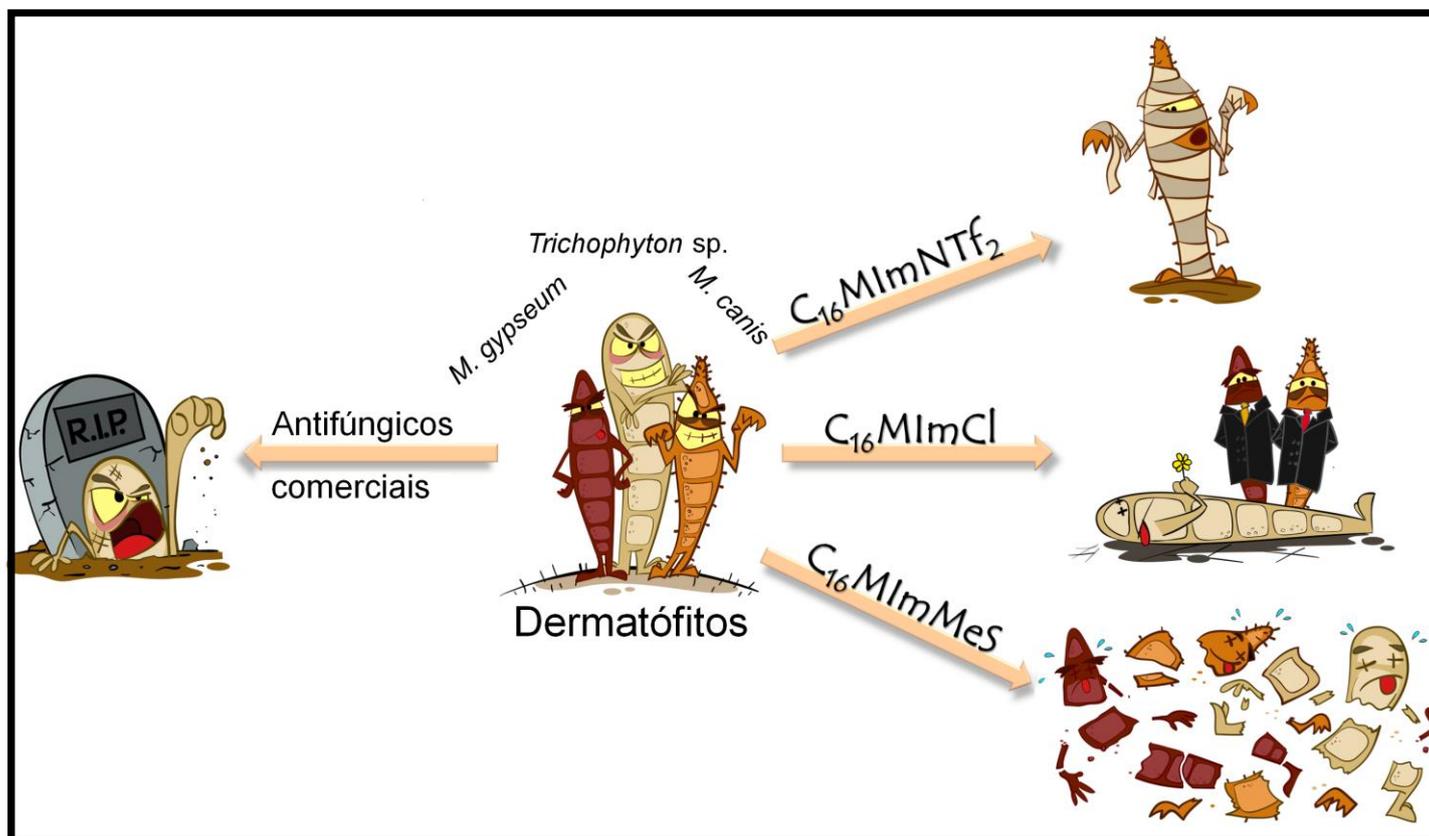


Figura 44. Esquema ilustrativo de representação do potencial antidermatofítico de SIMs e antifúngicos comerciais.

Na figura, é apresentado o efeito fungistático do $C_{16}MImNTf_2$, relatado também para a maioria dos antifúngicos; a ação fungicida seletiva de $C_{16}MImCl$ sobre apenas alguns isolados (no caso desse trabalho sobre os mais sensíveis) e o intenso e amplo poder fungicida do $C_{16}MImMeS$ sobre todos os isolados de *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*.

5.4. Avaliação da toxicidade

5.4.1. Avaliação da citotoxicidade (efeito sobre a proliferação e viabilidade celular)

Os resultados da análise sobre a citotoxicidade dos sais imidazólicos são apresentados na figura 45. Nenhum dos compostos interferiu de modo significativo no processo de proliferação celular e nem inviabilizou as células leucocitárias humanas avaliadas. Para o peróxido de hidrogênio, utilizado como controle positivo de citotoxicidade, observou-se uma diminuição no número de leucócitos e uma redução de aproximadamente 20% da viabilidade celular.

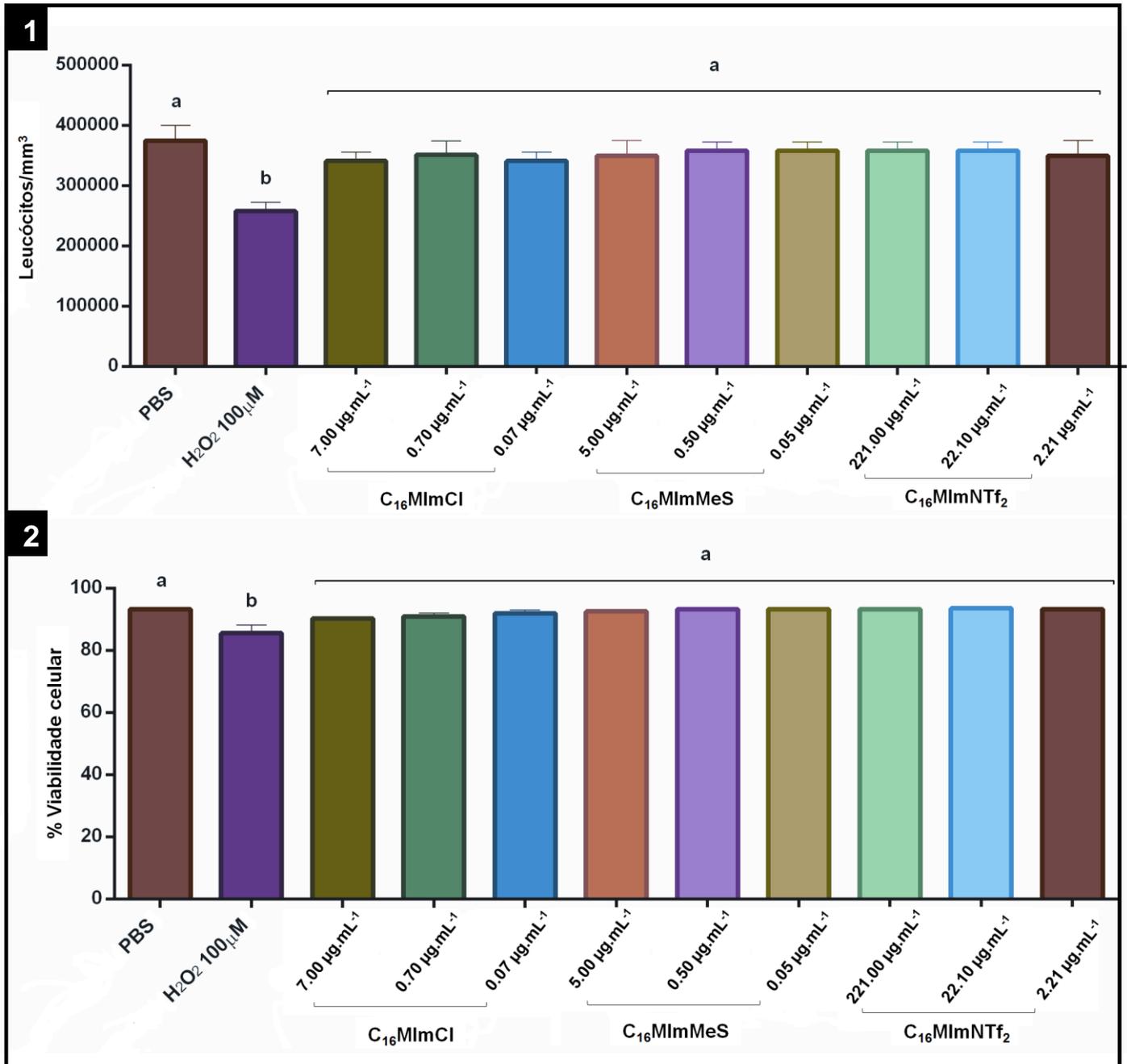


Figura 45. Gráficos da análise toxicológica. Efeitos dos SIMs C₁₆MImCl, C₁₆MImMeS e C₁₆MImNTf₂ sobre a (1) proliferação e (2) viabilidade celular. Barras com letras iguais indicam equivalência estatística.

Os SIMs diferiram estatisticamente do peróxido de hidrogênio, em todos os tratamentos, considerando as concentrações avaliadas correspondentes a média geométrica da CIM para os 45 dermatófitos e concentrações 10 e 100 vezes superiores (Tab. 6). A maior concentração testada para cada sal foi a seguinte: 7.00 µg/mL para C₁₆MImCl, 5.00 µg/mL para C₁₆MImMeS e 221.00 µg/mL para C₁₆MImNTf₂.

5.4.2. Avaliação da mutagenicidade (análise da frequência de micronúcleos) e genotoxicidade (dano ao DNA)

Quanto à análise da possibilidade de mutagênese e genotoxicidade ocasionadas por $C_{16}MImCl$, $C_{16}MImMeS$ e $C_{16}MImNTf_2$, os gráficos com os resultados são apresentados na figura 46.

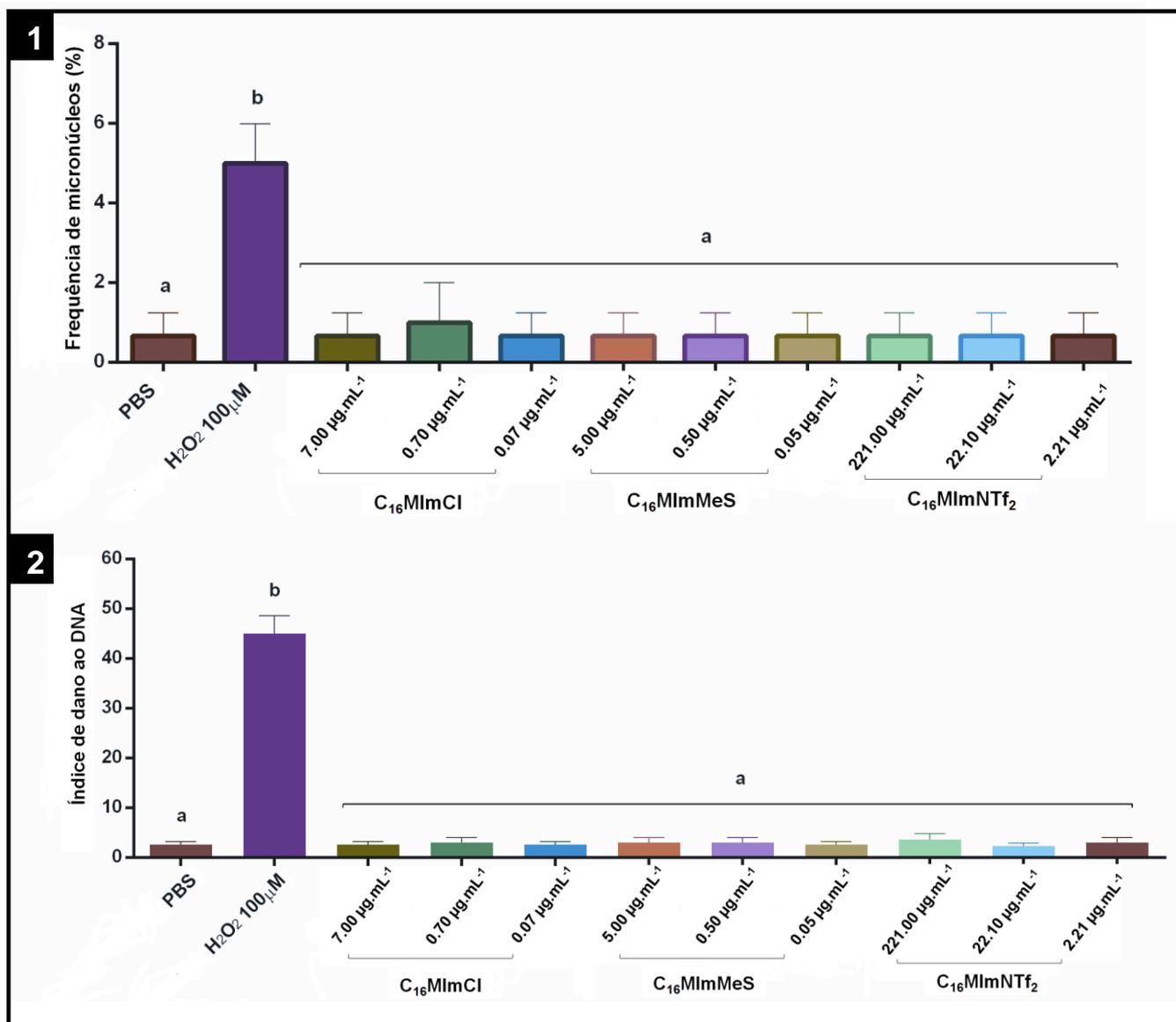


Figura 46. Gráficos da análise toxicológica. Efeitos dos SIMs $C_{16}MImCl$, $C_{16}MImMeS$ e $C_{16}MImNTf_2$ sobre a (1) frequência de micronúcleos e (2) dano ao DNA. Barras com letras iguais indicam equivalência estatística.

Constata-se que o peróxido de hidrogênio provocou uma elevação da ocorrência de micronúcleos de até aproximadamente 5%, com índice de dano ao DNA de cerca de 45%. Novamente, nenhum dos SIMs influenciou no surgimento de

micronúcleos ou causou dano significativo ao DNA, sendo que todos os compostos diferiram de modo estatístico do H₂O₂ 100.00 µM e foram semelhantes ao tampão PBS, utilizado como diluente das substâncias e controle negativo. Dessa forma, mutações e alterações no DNA não foram detectadas para os SMI, nas concentrações testadas e nessas condições experimentais.

Uma das metodologias mais utilizadas para avaliação de possíveis danos mutagênicos causados por fármacos ou novas biomoléculas é o teste de micronúcleo (MN). A investigação da frequência de MN é o padrão de teste de mutagenicidade OECD – *Guidelines for the testing of chemicals/ section 4: Health Effects – Mammalian Erythrocytes Micronucleos* (Test: nº 474) e recomendado pelo *Gene-Tox Program, Environmental Protection Agency – EPA/US*, pela sua capacidade e precisão em detectar possíveis agentes clastogênicos (quebra de cromossomos) e aneugênicos (segregação cromossômica anormal) (FENECH, 2000; RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003). Os micronúcleos são definidos como pequenas massas esféricas, extranucleares, constituídas de cromatina não incorporada ao núcleo principal da célula, durante as etapas finais da mitose, servindo como um biomarcador de danos nos cromossomos, instabilidade genética e, eventualmente, se houver uma exposição crônica à substância tóxica, risco de câncer (FENECH, 2000). Igualmente importante no screening de toxicidade de novos compostos o teste cometa é um método extremamente sensível para estudos de danos ao DNA em células individualizadas (MUKHOPADHYAY et al., 2004; COLLINS, 2009). Alterações genéticas são quase sempre prejudiciais (excetuando-se os casos de compostos que agem contra células neoplásicas), especialmente em organismos multicelulares, nos quais a modificação está mais inclinada a perturbar o desenvolvimento e a fisiologia extremamente complexos e, finalmente, sintonizados, de um organismo (SPIVAK et al., 2008). Enquanto o ensaio do cometa detecta lesões reversíveis, o teste de MN detecta lesões mais persistentes no DNA ou efeitos aneugênicos que não podem ser reparados (HARTMANN et al., 2003). Então, a partir da relevância experimental desses testes realizados, os SIMs não terem apresentado indícios de mutagenicidade e genotoxicidade, nas concentrações que foram efetivas contra os fungos, é um resultado certamente muito promissor para uma possível bioaplicação desses compostos nos casos de dermatofitose. Apesar disso, ainda há uma evidente necessidade de avaliações adicionais de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade dessas substâncias, considerando

outros modelos, principalmente utilizando-se parâmetros *in vivo*, e concentrações mais elevadas, para determinação de um perfil tóxico dos SIMs mais completo.

Corroborando com os resultados do presente trabalho, a toxicidade de seis sais imidazólicos, um deles trata-se do mesmo sal nesse estudo investigado toxicologicamente – o $C_{16}MImCl$, já foi também analisada por SCHREKKER et al. (2013). Os compostos $C_{10}MImCl$ (16 $\mu g/mL$), $C_{16}MImCl$ (10.00 $\mu g/mL$), $C_{16}MImPF_6$ (35.00 $\mu g/mL$), $C_{10}MImMeS$ (65.00 $\mu g/mL$), $C_{16}MImBF_4$ (16.00 $\mu g/mL$) e $C_{14}MImNTf_2$ (10 $\mu g/mL$), nessas respectivas concentrações, não foram citotóxicos e nem genotóxicos a leucócitos humanos, avaliados pelas mesmas metodologias empregadas nesse trabalho.

5.4.3. Avaliação do efeito sobre a estabilidade cromossômica

Por fim, o resultado de possível dano direto aos cromossomos, dos sais e controles, é demonstrado no gráfico da figura 47.

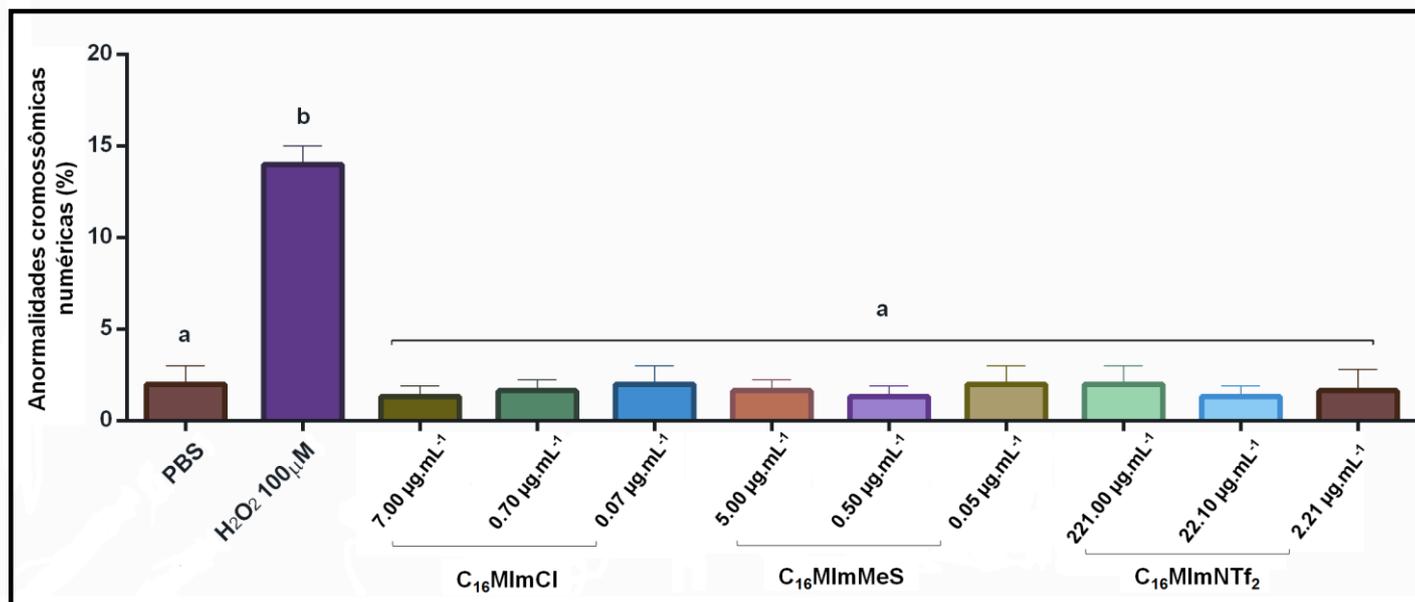
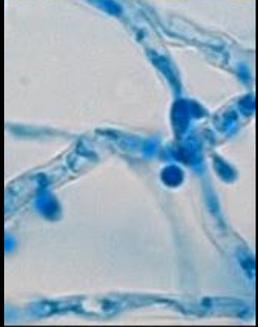
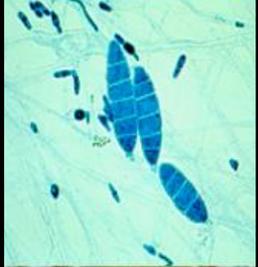


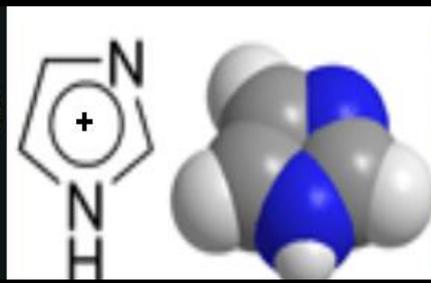
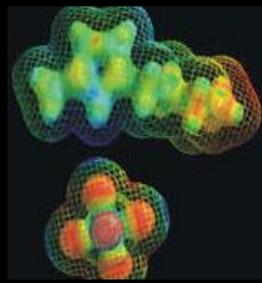
Figura 47. Gráfico da análise toxicológica. Efeitos dos SIMs $C_{16}MImCl$, $C_{16}MImMeS$ e $C_{16}MImNTf_2$ sobre a estabilidade cromossômica numérica. Barras com letras iguais indicam equivalência estatística.

Seguindo o mesmo padrão dos demais testes toxicológicos realizados, não foram observadas alterações numéricas cromossomais às células pós-exposição aos compostos químicos analisados. Enquanto que o peróxido de hidrogênio ocasionou aproximadamente 15% de anomalias cromossômicas numéricas, os SIMs

e o PBS foram estatisticamente diferentes do mesmo, não provocando anormalidades significativas. Com base nesse teste de avaliação da toxicidade, utilizando-se células leucocitárias humanas, em conjunto com os demais realizados, constata-se, que nas concentrações investigadas nesse estudo (concentrações até 100 vezes superiores às concentrações efetivas contra todos os fungos), C₁₆MImCl, C₁₆MImMeS e C₁₆MImNTf₂, não demonstraram citotoxicidade, mutagenicidade, genotoxicidade e também não foram capazes de ocasionar dano cromossômico. Essas evidências da análise toxicológica certamente representam um resultado muito promissor aliado à atividade biológica desses compostos, que neste estudo demonstraram forte e amplo potencial antifúngico.



CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

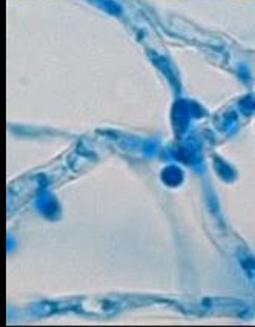
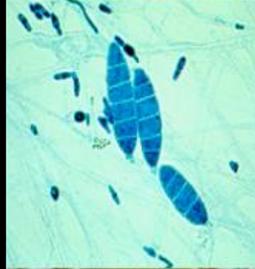


6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

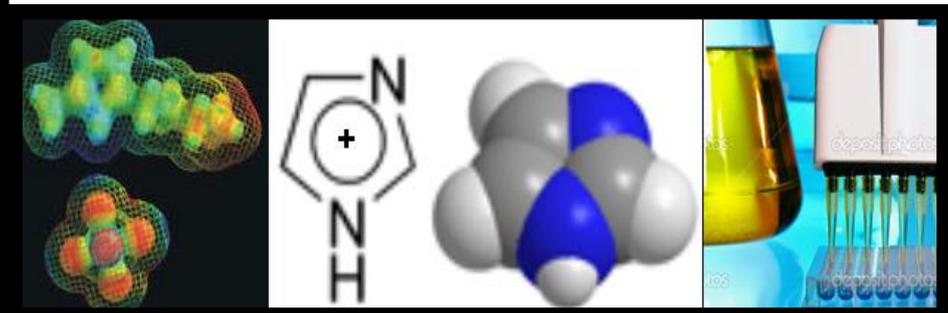
- ✓ Os 45 isolados clínicos dermatofíticos foram sensíveis aos 11 SIMs investigados (C_4MImCl , $C_4MImMeS$, $C_4MImOcS$, $C_9MImMeS$, $C_{10}MImCl$, $(C_{10})_2MImCl$, $C_{16}MImCl$, $C_{16}MImMeS$, $C_{16}MImNTf_2$, $C_{16}MImSaC$ e $C_{18}MImCl$). A faixa de CIM desses compostos foi de 0.02 – 50.00 $\mu g/mL$. Somente os sais $C_{16}MImCl$ e $C_{16}MImMeS$, bem como a terbinafina, foram fungicidas, sendo que $C_{16}MImMeS$ foi o único que exerceu esse efeito sobre 100% dos isolados (inclusive sobre as espécies multirresistentes). A faixa de CFM foi de 0.08 – 12.50 $\mu g/mL$.
- ✓ Os resultados mais promissores, referentes às menores concentrações inibitórias mínimas, foram observados para os sais com 16 átomos de carbono na cadeia lateral e ânions cloreto e metanossulfonato ($C_{16}MImCl$, $C_{16}MImMeS$). Em relação à análise estatística de comparação dos SIMs com os antifúngicos comerciais, todos os compostos foram equivalentes à TBF e/ou GSF e/ou CTZ, com exceção das moléculas com extremos de extensão de cadeia lateral, com 4 e 18 carbonos (C_4MImCl , $C_4MImMeS$, $C_4MImOcS$ e $C_{18}MImCl$), as quais não apresentaram medianas de CIM's correspondentes estatisticamente a dos antifúngicos analisados.
- ✓ Observou-se claramente modificações na micromorfologia dos dermatófitos multirresistentes pós-tratamento *in vitro* com os SIMs $C_{16}MImCl$, $C_{16}MImMeS$ e $C_{16}MImNTf_2$. O arranjo das hifas foi desestruturado, sendo que as mesmas apresentaram um aspecto de desidratação.
- ✓ O dano celular ocasionado pelos SIMs variou entre $\approx 60 - 80\%$, sendo que as percentagens de dano dos compostos $C_{16}MImCl$ e $C_{16}MImMeS$ foram estatisticamente comparáveis às do CTZ.
- ✓ Na determinação das curvas de morte dos dermatófitos, relativas a ação do $C_{16}MImMeS$, constatou-se que o efeito fungicida dessa substância inicia em 1 hora de incubação com os fungos, permanecendo nas 48 h de análise.
- ✓ Propõe-se que os 3 SIMs $C_{16}MImCl$, $C_{16}MImMeS$ e $C_{16}MImNTf_2$ exerçam sua ação antidermatofítica por interação com a membrana celular dos dermatófitos, de modo a reduzirem o conteúdo total de ergosterol das células e apresentarem capacidade de complexação com esse esteroide, além de ocasionarem lise das estruturas fúngicas. $C_{16}MImNTf_2$ foi o sal que mais

fracamente apresentou esses efeitos e C₁₆MImMeS também demonstrou indícios de mecanismo de ação adicionalmente a nível de parede celular, sugerindo-se nesse caso esse diferencial do composto como uma das razões pelo intenso e amplo efeito fungicida do mesmo.

- ✓ C₁₆MImCl, C₁₆MImMeS e C₁₆MImNTf₂, nas concentrações analisadas, concentrações essas até 100 vezes superiores às concentrações efetivas contra todas as species fúngicas, e nas condições experimentais empregadas na avaliação da toxicidade, não foram citotóxicos, mutagênicos e genotóxicos a leucócitos humanos e nem ocasionaram anormalidades cromossômicas.
- ✓ Como perspectiva do presente trabalho, considerando todo o contexto apresentado, almeja-se continuar os estudos de investigação dos SIMs contra dermatófitos e demais fungos patogênicos. Propõe-se pesquisas futuras dos mecanismos moleculares envolvidos na reversão da resistência e também a verificação de especificidades do comportamento desses compostos dentro e fora das células fúngicas. Além disso, pretende-se averiguar o potencial antifúngico dessas substâncias em modelos de infecção dermatofítica *ex vivo*, caracterizando a farmacocinética e farmacodinâmica envolvidas, bem como avaliar mais amplamente a toxicidade dos SIMs (nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, entre outros parâmetros). Todas essas investigações futuras complementarão as já realizadas, para uma proposição mais certificada de uso alternativo, seguro e efetivo dessas moléculas para o tratamento de dermatofitose, uma micose cutânea de prevalência mundial, que sabidamente apresenta uma problemática em relação ao tratamento convencionalmente utilizado.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHTERMAN, R. R.; WHITE, T. C. Dermatophytes. **Current Biology**, [S.l.], v. 23, n. 13, p. R551-R552, July 2013.

ADEFEMI, S. A.; ODEIGAH, L. O.; ALABI, K. M. Prevalence of dermatophytosis among primary school children in Oke-oyi community of Kwara state. **Nigerian Journal of Clinical Practice**, Nigéria, v. 14, p. 23-28, 2011.

AGOSTINHO, K. M. et al. Doenças dermatológicas frequentes em unidade básica de saúde. **Cogitare Enfermagem**, Aracaju, v. 18, n. 4, p. 715-721, 2013.

AMBOOKEN, B.; BINITHA, M. P.; CHANDRAN, B. Kerion due to *Microsporum gypseum* in a 1-month-old infant. **International Journal of Trichology**, [S.l.], v. 5, n. 4, p. 214-216, Dec. 2013.

ANAHORY, B.; SANTOS, P.; BORGES, M. Querion do couro cabeludo – A propósito de um caso clínico. **Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar**, [S.l.], v. 29, n. 6, p. 394-397, Nov. 2013.

ANDERSON, E. B.; LONG, T. E. Imidazole- and imidazolium-containing polymers for biology and material science applications. **Polymer**, Virgínia, v. 51, p. 2447-2454, Feb. 2010.

ANDOH, T.; TAKAYAMA, Y.; KURAIISHI, Y. Involvement of leukotriene B4 in dermatophyte-related itch in mice. **Pharmacological Reports**, Japão, v. 66, p. 699-703, Apr. 2014.

ANGAMUTHU, M. et al. Controlled-release injectable containing Terbinafine/PLGA microspheres for Onychomycosis Treatment. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Mississippi, v. 103, p. 1178-1183, Feb. 2014.

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

ARAÚJO, A. J. G. et al. Ocorrência de onicomicose em pacientes atendidos em consultórios dermatológicos da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 3, p. 299-308, jun. 2003.

ARENAS, R. et al. *Tinea capitis*. Emergencia de *Microsporum audouinii* y *Trichophyton tonsurans* en la República Dominicana. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, Santo Domingo, v. 101, n. 4, p. 330-335, mayo 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. **NBR 10520**: informação e documentação: citações em documentos: apresentação. Rio de Janeiro, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. **NBR 14724**: informação e documentação: trabalhos acadêmicos: apresentação. Rio de Janeiro, 2011.

ASTE, N.; PAUL, M.; BIGGIO, P. *Tinea capitis* in adults. **Mycoses**, [S.I.], v. 39, p. 299-301, 1996.

ASTE, N.; PAU, M.; ASTE, N. *Tinea manuum* bullosa. **Mycoses**, Itália, v. 48, p. 80-81, Oct. 2003.

BADE, R.; CHAN, H.; REYNISSON, J. Characteristics of known drug space. Natural products, their derivatives and synthetic drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Nova Zelândia, v. 45, p. 5646-5652, 2010.

BAEZA, L. C. et al. Epidemiology of the dermatophytosis in public institutions of the region of Araraquara city – SP. **Revista de Ciências Farmaceuticas**, São Paulo, v. 25, n. 2, p.119-124, 2004.

BAHNOUS, M. et al. Synthesis, crystal structure and antibacterial activity of new highly functionalized ionic compounds based on the imidazole nucleus. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.I.], v. 23, n. 5, p. 1274-1278, Mar. 2013.

BARLIAN, A. et al. Damage in Fungal Morphology Underlies the Antifungal Effect of Lyophilisate of Granular Gland Secretion *Duttaphrynus melanostictus* from Frog. **Journal of Biological Sciences**, [S.I.], v. 11, n. 3, p. 282-287, 2011.

BARREIRO, E. J. A importância da síntese de fármacos na produção de medicamentos. **Química Nova**, [S.I.], v. 14, n. 3, p. 179-188, 1991.

BASSANESI, M. C.; SEVERO, L. C.; WEISS, H. C. *Trichophyton violaceum* no Rio Grande do Sul: relato de um caso. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [S.I.], v. 59, p. 233-234, 1984.

BASSANESI, M. C. et al. Microepidemias de *Trichophyton tonsurans* e *Trichophyton violaceum* em Imbé e Tramandaí, RS. **Revista AMRIGS**, [S.I.], v. 32, p. 155-157, 1988.

BASSIRI-JAHROMI, S.; SADEGHI, G.; PASKIAEE, F. A. Evaluation of the association of superficial dermatophytosis and athletic activities with special reference to its prevention and control. **International Journal of Dermatology**, Iran, v. 49, p. 1159-1164, 2010.

BENDJABALLAH-LALIAM, A.; DJAZER, H. Épidémiologie des teignes du cuir chevelu de la banlieue de Tipasa, Algérie. **Journal de Mycologie Médicale**, Argélia, v. 24, p. 141-143, Apr. 2014.

BERGAMO, V. Z. et al. Imidazolium salts as antifungal agents: strong antibiofilm activity against multidrug-resistant *Candida tropicalis* isolates. **Letters in Applied Microbiology**, Porto Alegre, v. 60, n. 1, p. 66-71, 2014.

BICZAK, R. et al. The role of the anion in the toxicity of imidazolium ionic liquids. **Journal of Hazardous Materials**, Polônia, v. 274, p. 181-190, Mar. 2014.

BITENCOURT, T. A. et al. Trans-chalcone and quercetin down-regulate fatty acid synthase gene expression and reduce ergosterol content in the human pathogenic dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, Ribeirão Preto, v. 13, p. 229-237, Sept. 2013.

BHOSLE, S. R. et al. Ergosterol content of several wood decaying fungi using a modified method. **International Journal of Pharmacy & Life Sciences**. Índia, v. 2, n. 7, p. 916-918, June 2011.

BOHN, M.; KRAEMER, K. T. Dermatopharmacology of ciclopirox nail lacquer topical solution 8% in the treatment of onychomycosis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [S.I.], v. 43, p. S57-S69, 2000.

BOLDEWIJN, O. Y. et al. Hepatitis attributed to the use of terbinafine. **Nederlands tijdschrift voor geneeskunde**, [S.I.], v. 140, n. 12, p. 669-672, Mar. 1996.

BOUDGHENE-STAMBOULI, O.; MERAD-BOUDIA, A. Fixed drug eruption induced by griseofulvin. **Dermatológica**, [S.I.], v. 179, n. 2, p. 92-93, 1989.

BOULTON, K. A. et al. Dermatophytosis in zoo macropods: a questionnaire study. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, [S.I.], v. 44, n. 3, p. 555-563, 2013.

BRILHANTE, R. S. et al. Epidemiology and ecology of dermatophytoses in the City of Fortaleza: *Trichophyton tonsurans* as important emerging pathogen of *Tinea capitis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S.I.], v. 33, n. 5, p. 417-425, Oct. 2000.

BUROW, M. E. et al. Differences in susceptibility to tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis among MCF-7 breast cancer cell variants. **Cancer Research**, New Orleans, v. 58, n. 21, p. 4940-4946, Nov. 1998.

CAFARCHIA, C. et al. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of dermatophytes (Review). **Infection, Genetics and Evolution**, Itália, v. 20, p. 336-351, Sept. 2013.

CALADO, N. B. et al. A 7-year survey of superficial and cutaneous mycoses in a public hospital in Natal, northeast Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, Natal, v. 42, p. 1296-1299, 2011.

CALO, S. et al. Antifungal drug resistance evoked via RNAi - dependent epimutations. **Nature**, [S.I.], v. 513, p. 555-573, July 2014.

CALVO, M. C. R. et al. Micosis más frecuentes em nuestro médio. **Revista Iberoamericana de Micología**. Espanha, v. 2, n. 3, p. 1-15, mar. 2002.

CAMPANHA, A. M.; TASCA, R. S.; SVIDZINSKI, T. I. E. Dermatomicoses: Frequência, Diagnóstico Laboratorial e Adesão de Pacientes ao Tratamento em um

Sistema Público de Saúde. **Latin American Journal of Pharmacy**, Paraná, v. 26, n. 3, p. 442-448, ene. 2009.

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

CARRASCO, H. et al. Antifungal Activity of Eugenol Analogues. Influence of Different Substituents and Studies on Mechanism of Action. **Molecules**, [S.l.], v. 17, p. 1002-1024, 2012.

CARSON, L. et al. Antibiofilm activities of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquids. **Green Chemistry**, [S.l.], v. 11, p. 492-497, Feb. 2009.

CARTER, G. R. Dermatophytes and Dermatophytoses. **Diagnostic Procedure in Veterinary Bacteriology and Mycology**, [S.l.], v. 5, p. 381-404, 1990.

CARVALHO, A. M. T. M. Dermatofitose por *Microsporium canis*. 38 f. Monografia (Especialização) – **Clínica Médica e Cirúrgica em Pequenos Animais**, Brasília, 2010.

CASSOL, C. C. et al. A Simple and Practical Method for the Preparation and Purity Determination of Halide-Free Imidazolium Ionic Liquids. **Advanced Synthesis & Catalysis**, [S.l.], v. 348, p. 243-248, 2006.

CERVELATTI, E. P. et al. Molecular cloning and characterization of a novel ABC transporter gene in the human pathogen *Trichophyton rubrum*. **Medical Mycology**, [S.l.], v. 44, n. 2, p. 141-147, Mar. 2006.

CHABASSE, D. Dermatophytes: Where do they come from? How did they turn to parasites? **Journal de Mycologie Médicale**, França, v. 18, p. 27-35, Dec. 2008.

CHADEGANIPOUR, M.; NILIPOUR, S.; HAVAEI, A. *In vitro* evaluation of griseofulvin against clinical isolates of dermatophytes from Isfahan. **Mycoses**, Iran, v. 47, p. 503-507, Dec. 2004.

CHALUPOVÁ, J. et al. Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. **Biotechnology Advances**, Czech Republic, v. 32, p. 230-241, Nov. 2014.

CHANG, C. et al. The Safety of Oral Antifungal Treatments for Superficial Dermatophytosis and Onychomycosis: A Meta-analysis. **The American Journal of Medicine**, [S.l.], v. 120, n. 9, p. 791-798, Sept. 2007.

CHEMDRAW Std 14.0. Aplicativo para desenhos de estruturas químicas. Acesso em 4 nov. 2014.

CHEMSPIDER – Search and Share chemistry (Royal Society of Chemistry). Disponível em: <<http://www.rsc.org/>>. Acesso em: 4 nov. 2014.

CHENG, S.; CHONG, L. A prospective epidemiological study on *tinea pedis* and onychomycosis in Hong Kong. **Chinese Medical Journal**, Hong Kong, v. 115, n. 6, p. 860-865, 2002.

CHERMETTE, R.; FERREIRO, L.; GUILLOT, J. Dermatophytoses in Animals. **Mycopathologia**, [S.l.], v. 166, p. 385-405, May 2008.

CHIMELLI, P. A. V. et al. Dermatophyte agents in the city of São Paulo, from 1992 to 2002. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 45, n. 5, p. 259-263, 2003.

CHIOU, C. C. et al. Synergy, Pharmacodynamics, and Time-Sequenced Ultrastructural Changes of the Interaction between Nikkomycin Z and the Echinocandin FK463 against *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Taiwan, v. 45, n. 12, p. 3310-3321, Dec. 2001.

CHOUDHARY, N. S. et al. Terbinafine Induced Liver Injury: A Case Report. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, Índia, v. 4, n. 3, p. 264-265, Sept. 2014.

CINOTTI, E. et al. Dermatophytose de la peau glabre diagnostiquée par microscopie confocale. **Annales de Dermatologie et de Vénérologie**, França, v. 141, n. 2, p. 150-152, 2014.

CLARK, G. L.; FELDMAN, M. P.; GERTLER, M. S. **The Oxford Handbook of Economic Geography**. Oxford: Oxford University Press, 2000.

CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi**. Approved Standard – Second Edition. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. Approved Standard – Third Edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. Fourth Informational Supplement. CLSI document M27-S4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

COELHO, M. P. P. et al. Micoses observadas em pacientes atendidos no Hospital Universitário, Florianópolis, Santa Catarina. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Florianópolis, v. 37, n. 1, p. 27-30, 2005.

COLEMAN, D. et al. Antimicrobial toxicity studies of ionic liquids leading to a 'hit' MRSA selective antibacterial imidazolium salt. **Green Chemistry**, Dublin, v. 14, p. 1350-1356, Jan. 2012.

COLLINS, A. R. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. **Mutation Research**, [S.l.], v. 681, n. 1, p. 24-32, Feb. 2009.

COPETTI, M. V. et al. Dermatophytes isolated from dogs and cats suspected of dermatophytosis in Southern Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, Santa Maria, v. 34, n. 2, p. 119-124, 2006.

CORRALO, D. S.; HERAS-ALONSO, M. E.; ACEBES, L. O. Infecciones cutáneas. **Medicine**, Madrid, v. 11, n. 47, p. 2755-2763, 2014.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992.

CORTEZ A. C. A. et al. Frequency and aetiology of dermatophytosis in children age 12 and under in the state of Amazonas, Brazil. **Revista Iberoamericana de Micología**, España, v. 29, n. 4, p. 223-226, feb. 2012.

COSTA, C. B. **Dermatofitoses: Gêneros, principais espécies antropofílicas, diagnóstico laboratorial e tratamento**. 54 f. Monografia (Especialização) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

DALLA LANA, A. J. **Atividade antifúngica da terbinafina, griseofulvina e saponinas extraídas de *Chenopodium quinoa* contra isolados de dermatófitos multirresistentes**. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

DAMÁZIO, P. M. R. B. et al. Epidemiologia, etiologia e formas clínicas das dermatofitoses em Pernambuco, 1995-2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Recife, v. 40, n. 4, p. 484-486, ago. 2007.

DANIEL, C. R.; JELLINEK, N. J. Commentary: The illusory *tinea unguium* cure. **Journal of the American Academy of Dermatology**, Mississippi, v. 62, p. 415-417, Mar. 2010.

DARKES, M. J.; SCOTT, L. J.; GOA, K. L. Terbinafine: a review of its use in onychomycosis in adults. **American Journal of Clinical Dermatology**, [S.l.], v. 4, n. 1, p. 39-65, 2003.

DEGREEF, H. Clinical forms of dermatophytosis (ringworm infection). **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 257-265, 2008.

DEL BOZ-GONZÁLEZ, J. Tendencias de la *tinea capitis* en España. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, Málaga, v. 103, n. 4, p. 288-293, 2012.

DEL PALACIO, H. A.; LOPEZ-GOMEZ, S.; LASTRA, F. G. A comparative Double-blind study of terbinafine (limisil) and griseofulvin in *tinea corporis* and *tinea cruris*. **Clinical and Experimental Dermatology**, [S.l.], v. 15, n. 3, p. 210-216, May 1990.

DEL PALACIO, A. et al. Trends in the treatment of dermatophytosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, Espanha, v. 699, p. 148-158, 2000.

DIAS, T. et al. Tinha do couro cabeludo em crianças de Goiânia, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S.l.], v. 36, n. 23, p. 53-655, nov. 2003.

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

DITTMAR, W. Non-European open clinical studies on the efficacy and tolerance of ciclopiroxolamine in dermato-mycoses. **Arzneimittel-Forschung**, Alemanha, v. 31, n. 8, p. 1381-1385, 1981.

DOCTOR FUNGUS. Disponível em: <<http://www.doctorfungus.org/mycoses/index.php>>. Acesso em: 25 out. 2014.

DOLTON, M. J. et al. Terbinafine in Combination with Other Antifungal Agents for Treatment of Resistant or Refractory Mycoses: Investigating Optimal Dosing Regimens Using a Physiologically Based Pharmacokinetic Model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.l.], v. 58, n. 1, p. 48-54, Jan. 2014.

DONATO, R. K. **Líquidos iônicos como compatibilizantes para a Preparação de Nanocompósitos Poliméricos de Poliolefinas Apolares e Sílicas**. 108 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

DONG, B. et al. Aggregation behavior of long-chain imidazolium ionic liquids in aqueous solution: Micellization and characterization of micelle microenvironment. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [S.l.], v. 317, p. 666-672, 2008.

DUMAN, D.; TURHAL, N. S.; DUMAN, D. G. Fatal aplastic anemia during treatment with ketoconazole. **The American Journal of Medicine**, [S.l.], v. 111, n. 9, p. 737, Dec. 2001.

DUPONT, J.; SOUZA, R. F.; SUAREZ, P. A. Z. Ionic liquid (molten salt) phase organometallic catalysis. **Chemical Reviews**, [S.l.], v. 102, p. 3667-92, 2002.

DURAN, R.; CARY, J. W.; CALVO, A. M. Role of the Osmotic Stress Regulatory Pathway in Morphogenesis and Secondary Metabolism in Filamentous Fungi. **Toxins (Basel)**, [S.l.], v. 2, n. 4, p. 367-381, Apr. 2010.

EISENBERG, D. M. et al. Unconventional medicine in the United States. Prevalence, costs, and patterns of use. **New England Journal of Medicine**, v. 328, n. 4, p. 246-252, Jan. 1993.

EL FARI, M. et al. An epidemic of *tinea corporis* caused by *Trichophyton tonsurans* among children (wrestlers) in Germany. **Mycoses**, Berlin, v. 43, p. 191-196, Aug. 2000.

ELLABIB, M. S.; KHALIFA, Z.; KAVANAGH, K. Dermatophytes and other fungi associated with skin mycoses in Tripoli, Libya. **Mycoses**, Líbia, v. 45, p. 101-104, 2002.

ELSHAARAWYA, R. F. M.; JANIAC, C. Toward new classes of potent antibiotics: Synthesis and antimicrobial activity of novel metallosaldacheimidazolium salts. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Alemanha, v. 75, p. 31-42, 2014.

ESCALANTE, A. et al. Evidence for the Mechanism of Action of the Antifungal Phytolaccoside B Isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. **Journal of Natural Products**, [S.I.], v. 71, n. 10, p. 1720-1725, 2008.

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**, [S.I.], v. 40, n. 9, p. 3204-3208, Sept. 2002.

FACHIN, A. L. et al. Role of the ABC transporter TruMDR2 in terbinafine, 4-nitroquinoline N-oxide and ethidium bromide susceptibility in *Trichophyton rubrum*. **Journal of Medical Microbiology**, [S.I.], v. 55, n. 8, p. 1093-1099, Aug. 2006.

FALAHATI, M. et al. Epidemiology of dermatophytoses in an area south of Tehran, Iran. **Mycopathologia**, Iran, v. 156, n. 4, p. 279-287, 2003.

FARAL-TELLO, P. et al. Imidazolium compounds are active against all stages of *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Uruguai, v. 43, n. 3, p. 262-268, Mar. 2014.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, [S.I.], v. 455, n. 2, p. 81-95, 2000.

FENG, J. et al. *Tinea Infection* with Scutula-like Lesions Caused by *Microsporium gypseum* in a SLE Patient: Case Report and Literature Review. **Mycopathologia**, China, v. 176, p. 255-258, Aug. 2013.

FERNANDES, N. C.; AKITI, T.; BARREIROS, M. G. C. Dermatophytoses in children: study of 137 cases. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [S.I.], v. 43, n. 2, p. 83-85, Apr. 2001.

FERNANDES, S. et al. Kerion caused by *Microsporium audouinii* in a child. **Medical Mycology Case Reports**, Portugal, v. 2, p. 52-54, Feb. 2013.

FERNÁNDEZ-TORRES, B. et al. Collaborative Evaluation of Optimal Antifungal Susceptibility Testing Conditions for Dermatophytes. **Journal of Clinical Microbiology**, Barcelona, v. 40, n. 11, p. 3999-4003, nov. 2002.

FERNÁNDEZ-TORRES, B. **Sensibilidad antifúngica de los dermatofitos**. 119 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Espanya, 2005.

FERREIRA, M. P. S. B. et al. Antifungal activity of synthetic naphthoquinones against dermatophytes and opportunistic fungi: preliminary mechanism-of-action tests. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, Manaus, v. 13, n. 26, p. 1-6, 2014.

FLORES, C. R. et al. *Tinea manuum* inflamatória. **Anales de Pediatría**, Espanha, v. 61, n. 4, p. 344-352, 2004.

FRANZOI, A. C. et al. Incorporação de líquidos iônicos e nanopartículas metálicas na construção de sensores eletroquímicos. **Química Nova**, Brasil, v. 34, n. 6, p. 1042-1050, mar. 2011.

FRASER, C. M. **Manual Merk de Veterinária**. 7. ed. São Paulo: Roca, 1996.

FREITAS, C. F. N. P. et al. Ichthyosis associated with widespread *tinea corporis*: report of three cases. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Paraná, v. 88, n. 4, p. 627-630, 2013.

FROST, D. J. et al. A Whole-Cell *Candida albicans* Assay for the Detection of Inhibitors towards Fungal Cell Wall Synthesis and Assembly. **The Journal of Antibiotics**, [S.l.], v. 48, n. 4, p. 306-310, Apr. 1995.

FULLER, L. C. et al. British Association of Dermatologists' guidelines for the management of *tinea capitis* 2014. **British Journal of Dermatology**, Londres, v. 171, p. 454-463, June 2014.

FURTADO, M. S. S. et al. *Tinea pedis* na cidade de Manaus-AM, Brasil. **Acta Amazonica**, [S.l.], v. 20, p. 131-136, dez. 1990.

GAFFI (2014) Global action fund for fungal infection. Disponível em: <<http://www.gaffi.org/>>. Acesso em: 14 out. 2014.

GALGANO, P. D. **Líquidos iônicos tensoativos: Correlação entre Estrutura Molecular e Propriedades Micelares de Cloretos de 1,3-dialquilimidazólio**. 227 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

GALLO, M. G.; LANFRANCHI, P.; POGLAYEN, G. Seasonal 4-year investigation into the role of the alpine marmot (*Marmota marmota*) as a carrier of zoophilic dermatophytes. **Medical Mycology**, v. 43, n. 7, p. 373-379, Jan. 2005.

GAO, Y. et al. Selective inhibition of glycosyltransferases by bivalent imidazolium salts. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Canadá, v. 21, p. 1305-1311, Jan. 2013.

GENTLES, J. C.; HOLMES, J. G. Foot ringworm in coal miners. **British Journal of Industrial Medicine**, [S.l.], v. 14, p. 22-29, 1957.

GHANNOUM, M. A. Future of antimycotic therapy. **Dermatology and Therapy**, [S.l.], v. 3, p. 104-111, 1997.

GHELARDI, E. et al. Potential of Ergosterol Synthesis Inhibitors to Cause Resistance or Cross-Resistance in *Trichophyton rubrum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Itália, v. 58, n. 5, p. 2825-2829, May 2014.

GHOSH, A. et al. Thermal effects of ionic liquid dissolution on the structures and properties of regenerated wool keratin. **Polymer Degradation and Stability**, Nova Zelândia, v. 108, p. 108-115, 2014.

GIDDEY, K. et al. Comprehensive analysis of proteins secreted by *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton violaceum* under *in vitro* conditions. **Journal of Proteome Research**, [S.I.], v. 6, n. 8, p. 3081-3092, 2007.

GOLAPAN, B. et al. Therapeutic effect of a multi-targeted imidazolium compound in hepatocellular carcinoma. **Biomaterials**, China, v. 35, p. 7479-7487, June 2014.

GONÇALVES, A. H. **Mecanismo de ação e toxicidade da anfotericina B no tratamento de micoses**. 29 f. Monografia (Especialização) - ICB Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

GORE, R. G. et al. A new generation of aprotic yet Brønsted acidic imidazolium salts: effect of ester/amide groups in the C-2, C-4 and C-5 on antimicrobial toxicity and biodegradation. **Green Chemistry**, [S.I.], v. 15, p. 2747-2760, 2013.

GROVER, C. et al. Combination of surgical avulsion and topical therapy for single nail onychomycosis: a randomized controlled trial. **British Journal of Dermatology**, [S.I.], v. 157, n. 2, p. 364-368, 2007.

GUDDING, R.; LUND, A. Immunoprophylaxis of bovine dermatophytosis. **The Canadian Veterinary Journal**, [S.I.], v. 36, p. 302-306, 1995.

GULCAN, A. et al. Prevalence of toenail onychomycosis in patients with type 2 diabetes mellitus and evaluation of risk factors. **Journal of the American Podiatric Medical Association**, [S.I.], v. 101, p. 49-54, 2011.

GUPTA, A. K. et al. *Tinea capitis*: an overview with emphasis on management. **Pediatric Dermatology**, [S.I.], v. 16, n. 3, p. 171-189, June 1999.

GUPTA, A. K.; KOHLI, Y. *In vitro* susceptibility testing of ciclopirox, terbinafine, ketoconazole and itraconazole against dermatophytes and nondermatophytes, and *in vitro* evaluation of combination antifungal activity. **British Journal of Dermatology**, Canadá, v. 149, p. 296-305, 2003.

GUPTA, A. K.; SKINNER, A. R.; COOPER, E. A. Evaluation of the efficacy of ciclopirox 0.77% gel in the treatment of *tinea pedis interdigitalis* (dermatophytosis complex) in a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **International Journal of Dermatology**, Canadá, v. 44, n. 7, p. 590-593, 2005.

GUPTA, A. K.; COOPER, E. A.; BOWEN, J. E. Meta-analysis: griseofulvin efficacy in the treatment of *tinea capitis*. **Journal of drugs in dermatology**, [S.I.], v. 7, n. 4, p. 369-372, Apr. 2008.

GUPTA, A. K.; DRUMMOND-MAIN, C. Meta-analysis of randomized, controlled trials comparing particular doses of griseofulvin and terbinafine for the treatment of *tinea capitis*. **Pediatric Dermatology**, [S.l.], v. 30, n. 1, p.1-6, Feb. 2013.

GÜRTLER, T. G. R.; DINIZ, L. M.; NICCHIO, L. *Tinea capitis* micro-epidemic by *Microsporum canis* in a day care center of Vitória – Espírito Santo (Brazil). **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Vitória, v. 80, n. 3, p. 267-272, 2005.

HAINER, B. L. Dermatophyte infections. **American Family Physician**, [S.l.], v. 67, n. 1, p. 101-108, 2003.

HAMDAN, J. S.; HAHN, R. C. Antifungal drugs for systemic mycosis: An overview of mechanism of action and resistance. **Anti-infective agents in medicinal chemistry**, [S.l.], v. 5, n. 4, p. 403-412, 2006.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. *In vitro* activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Austrália, v. 50, p. 195-199, 2002.

HANEKE, E. Fungal infections of the nail. **Seminars in Dermatology**, [S.l.], v. 10, p. 41-53, 1991.

HANSEN, M. B.; NIELSEN, S. E.; BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **Journal of Immunological Methods**, [S.l.], v. 119, p. 203-210, 1989.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **Goodman & Gilman – As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2003.

HARTMANN, A. et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, [S.l.], v. 18, n. 1, p. 45-51, 2003.

HARVEY, R. A.; CHAMPE, P. C.; FISHER, B. D. **Microbiologia ilustrada**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

HAVLICKOVA, B.; FRIEDRICH, M. The advantages of topical combination therapy in the treatment of inflammatory dermatomycoses. **Mycoses**, Alemanha, v. 51, n. 4, p. 16-26, Aug. 2008.

HAVLICHOVA, B.; CZAİKA, V. A.; FRIEDRICH, M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. **Mycoses**, Alemanha, v. 51, n. 4, p. 2-15, Sept. 2008.

HAWKINS, D. M.; SMIDT, A. C. Superficial Fungal Infections in Children. **Pediatric Clinics of North America**, [S.l.], v. 61, p. 443-455, 2014.

HAY, R. J. The future of onychomycosis therapy may involve a combination of approaches. **British Journal of Dermatology**, [S.l.], v. 145, n. 60, p. 3-8, Oct. 2001.

HAY, R. Literature review. Onychomycosis. **Journal of the European Academy of Dermatology**, [S.l.], v. 19, n. 1, p. 1-7, 2005.

HEMMERT, C. et al. Synthesis, structures, and antimalarial activities of some silver(I), gold(I) and gold(III) complexes involving N-heterocyclic carbene ligands. **European Journal of Medicinal Chemistry**, França, v. 60, p. 64-75, Feb. 2013.

HILLARY, T.; SUYS, E. An outbreak of *tinea capitis* in elderly patients. **International Journal of Dermatology**, [S.I.], v. 53, n. 2, p. e101-e103, Feb. 2014.

HOMBERG, M.; MAGIN, T. M. Novel Insights into Epidermal Keratin Function and Regulation. **International Review of Cell and Molecular Biology**, [S.I.], v. 311, p. 265-306, 2014.

HUANG, R. T. W. et al. Antimicrobial properties of ethoxyether-functionalized imidazolium salts. **Soft Matter**, Taiwan, v. 7, p. 8392-8400, July 2011.

INDIRA, G. et al. Clinicoetiologic investigations on superficial mycoses of Warangal (A.P) India. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, India, v. 4, p. S311-S319, Jan. 2014.

INOUYE, S. et al. Combined effect of heat, essential oils and salt on fungicidal activity against *Trichophyton mentagrophytes* in a foot bath. **Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi**, [S.I.], v. 48, n. 1, p. 27-36, 2007.

ITOH, H.; NAKA, K.; CHUJO, Y. Synthesis of gold nanoparticles modified with ionic liquid based on the imidazolium cation. **Journal of the American Chemical Society**, [S.I.], v. 126, n. 10, p. 3026-3027, 2004.

IWATA, K.; YAMASHITA, T.; UEHARA, H. *In Vitro* and *in Vivo* Activities of Piritrate (M-732), a New Antidermatophytic Thiocarbamate. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, [S.I.], v. 33, n. 12, p. 2118, 1989.

JAMBHRUNKAR, S. et al. Modulating *in vitro* release and solubility of griseofulvin using functionalized mesoporous silica nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, [S.I.], v. 434, p. 218-225, Aug. 2014.

JEAN-PAUL, L.; BEAUVAIS, A. Functional duality of the cell wall. **Current Opinion in Microbiology**, França, v. 20, p. 111-117, June 2014.

JUNGNICKEL, C. et al. Micelle formation of imidazolium ionic liquids in aqueous solution. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. Alemanha, v. 316, p. 278-284, 2008.

KAKOUROU, T.; UKSAI, U. Guidelines for the management of *tinea capitis* in children. **Pediatric Dermatology**, [S.I.], v. 27, n. 3, p. 226-228, June 2010.

KALAIVANAN, C.; CHANDRASEKARAN, M.; VENKATESALU, V. Screening of selected medicinal plants for *in vitro* antidermatophytic activity. **Journal de Mycologie Médicale**, [S.I.], v. 23, n. 4, p. 247-254, Dec. 2013.

KALINOWSKA, K. Epidemiology of Dermatophytes in Poland over the Past Decades. **Epidemiology Insights**, Polônia, n. 65, p. 31-50, Apr. 2012.

KANE, J. et al. **A clinical guide and laboratory handbook of dermatophytes and other filamentous fungi from skin, hair and nails**. 1. ed. Belmont: Star Publishing Company, 1997.

KANG, J. et al. **Plant ABC Transporters**. Switzerland: Arabidopsis Book Springer, 2011.

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

KAUFMAN, G. et al. Markers for host – induced gene expression in *Trichopyton* dermatophytosis. **Infection and Immunity**, [S.l.], v. 73, n. 10, p. 6584-6590, 2005.

KAYE, D. Nizoral (ketoconazole): Drug Safety Communication - Potentially Fatal Liver Injury, Risk of Drug Interactions and Adrenal Gland Problems, 2013. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/SafetyAlertsforHumanMedicinalProducts/ucm362672.htm>>. Acesso em: 15 out. 2014.

KAZEMI, A. *Tinea unguium* in the North-West of Iran (1996-2004). **Revista Iberoamericana de Micología**, Iran, v. 24, p. 113-117, 2007.

KECHIA, F. A. et al. Epidemiology of *tinea capitis* among school-age children in Meiganga, Cameroon. **Journal de Mycologie Médicale**, Cameroon, v. 24, p. 129-134, Apr. 2014.

KENNA, M. E.; ELEWSKI, B. E. A US epidemiological survey of superficial fungal diseases. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [S.l.], v. 35, p. 539-542, 1996.

KHALDIN, A. A.; SERGEYEV, Y. V.; IZYUMOVA, I. M. Modern concepts of inguinal dermatophytosis: aetiology, epidemiology, clinical symptoms and effective treatment. **Russian Journal Dermal Vender Diseases**, [S.l.], v. 5, p. 1-8, 2005.

KHAZAEI, A. et al. Sulfonic acid functionalized imidazolium salts/FeCl₃ as novel and highly efficient catalytic systems for the synthesis of benzimidazoles at room temperature. **Scientia Iranica**, Iran, v. 18, p. 1365-1371, Aug. 2011.

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

KIRMIZIGUL, A. H. et al. Effectiveness of the Local Application of 1% Tioconazole in the Treatment of Bovine Dermatophytosis. **Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi**, [S.l.], v. 19, p. A191-A194, 2013.

KOCH, E.; ENGLISH, J. C. Diffuse Alopecia in an Adolescent Female: *Tinea capitis*. **Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology**, Pittsburgh, v. 27, p. 45-47, 2014.

KONEMAN, E. W. et al. **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. 6. ed. Lincott Company: Philadelphia, 2006.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário terapêutico Guanabara**. Rio de Janeiro: Guanabara/Koogan, 1998.

KULACKI, K. J.; LAMBERTI, G. A. Toxicity of imidazolium ionic liquids to freshwater algae. **Green Chemistry**, [S.l.], v. 10, p. 104-110, 2010.

LACAZ, C. S. et al. **Tratado de Micologia médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LACERDA, D. A. Co-infection of *Pseudomonas aeruginosa* and dermatophyte. **Einstein**, São Paulo, v. 6, n. 1, p. 97-98, 2008.

LAKSHMIPATHY, D. T.; KANNABIRAN, K. Review on dermatomycosis: pathogenesis and treatment. **Natural Science**, India, v. 2, n. 7, p. 726-731, Apr. 2010.

LAM, M. et al. Silicon Phthalocyanine 4 Phototoxicity in *Trichophyton rubrum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Ohio, v. 58, n. 6, p. 3029-3034, June 2014.

LATALA, A. et al. Marine toxicity assessment of imidazolium ionic liquids: Acute effects on the Baltic algae *Oocystis submarina* and *Cyclotella meneghiniana*. **Aquatic Toxicology**, Polônia, v. 73, p. 91-98, 2005.

LAU, K. M. et al. Two antifungal components isolated from *Fructus Psoraleae* and *Folium Eucalypti Globuli* by bioassay-guided purification. **The American Journal of Chinese Medicine**, [S.l.], v. 38, n. 5, p. 1005-1014, 2010.

LECERF, P.; ANDRÉ, J.; RICHERT, B. Prise en charge des onychomycoses. **Pathologie urogénitale**, [S.l.], v. 43, n. 11, p. 1240-1250, Nov. 2014.

LEE, W. J. et al. Decreasing incidence of *Trichophyton mentagrophytes* in Korea: analysis of 6,250 cases during the last 21-year-period (1992-2012). **Journal of Korean Medical Science**, Korea, v. 29, n. 2, p. 272-276, 2014.

LEHENKARI, E.; SILVENNOINEN-KASSINEN, S. Dermatophytes in northern Finland in 1982-90. **Mycoses**, [S.l.], v. 38, p. 411-414, 1995.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. São Paulo: Artmed, 2014.

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

LENHART, K. Griseofulvin-resistant Mutants in Dermatophytes. **Mycosen**, [S.l.], v. 12, n. 11, p. 655-660, May 1969.

LESTER, M. Ketoconazole 2 percent cream in the treatment of *tinea pedis*, *tinea cruris*, and *tinea corporis*. **Cutis**, [S.l.], v. 55, n. 3, p. 181-183, Mar. 1995.

LI, H. et al. Novel ionic liquid-type Gemini surfactants: Synthesis, surface property and antimicrobial activity. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, China, v. 395, p. 116-124, 2012.

LIMA, E. O. **Estudo das dermatófitoses em João Pessoa - Paraíba e da atividade antifúngica de plantas medicinais da região contra alguns dos agentes isolados**. 179 f. Tese (Doutorado em microbiologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Paraíba, 1996.

LIS, R. et al. Synthesis and antiarrhythmic activity of novel 3-alkyl-1-[omega.-[4 [(alkylsulfonyl)amino]phenyl]-omega. hydroxyalkyl]-1H-imidazolium salts and related compounds. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 30, n. 12, p. 2303-2309, Dec. 1987.

LITAIEM, N. et al. Epidemiology of *tinea capitis* in northern Tunisia. **Journal de Mycologie Médicale**, Tunísia, v. 24, p. 175-176, 2014.

LIU, L. et al. Main-chain imidazolium oligomer material as a selective biomimetic antimicrobial agent. **Biomaterials**, USA, v. 33, p. 8625-8631, Aug. 2012.

LIU, L. et al. Short imidazolium chains effectively clear fungal biofilm in keratitis treatment. **Biomaterials**, USA, v. 34, p. 1018-1023, 2013.

LOPES, J. O. et al. Tinha por *Trichophyton violaceum* no Rio Grande do Sul. **Revista da AMRIGS**, [S.l.], v. 38, p. 224-225, 1994.

LOPES, J. O. et al. A ten-year survey of onychomycosis in the central region of the Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, Santa Maria, v. 41, n. 3, p. 147-149, 1999a.

LOPES, J. O. et al. A ten-year survey of *tinea pedis* in the central region of the Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, Santa Maria, v. 41, n. 2, abr.1999b.

LÓPEZ-VILLAESCUSA, M. T. et al. Lesión anular de crecimiento centrífugo. **SEMERGEN**, 2014. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1138359314000367>> Acesso em: 25 out. 2014.

LOURENÇO, A. Microbiologia. Disponível em: <
<http://www.microbiologia.vet.br/Antifungicos.pdf>>. Acesso em: 4 nov. 2014.

LUNDE, C. S.; KUBO, I. Effect of Polygodial on the Mitochondrial ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, [S.l.], v. 44, n. 7, p. 1943-1953, July 2000.

LUCZAK, J. et al. Thermodynamics of micellization of imidazolium ionic liquids in aqueous solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, [S.l.], v. 336, p. 111-116, 2009.

MA, J. M. et al. Acute toxicity and effects of 1-alkyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquids on Green algae. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S.l.], v. 73, p. 1465-1469, 2010.

MACHADO, K. E. et al. Antifungal activity of *Eugenia umbelliflora* against dermatophytes. **Natural Product Communications**, [S.l.], v. 4, n. 9, p. 1181-1184, Sept. 2009.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudo disciplinares. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 429-438, May 2002.

MACIEL, A. S.; VIANA, J. A. Dermatofitose em cães e gatos: uma revisão – primeira parte e segunda parte. **Clínica Veterinária**, [S.l.], n. 57, p. 48-80, ago. 2005.

MADRID, I. M.; MATTEI, A. S. **Programa de zoonoses da região Sul: Manual de zoonoses**. 3. ed., 136 p., v. 2, 2011.

MADRID, I. M. et al. Dermatofitose neonatal canina por *Microsporum gypsum*. **Veterinária e Zootecnia**, Pelotas, v. 19, n. 1, p. 73-78, 2012.

MAGAGNIN, C. M. **Perfil de suscetibilidade a antifúngicos de dermatófitos isolados de pacientes com insuficiência renal crônica**. 30 f. Monografia (Trabalho de conclusão de curso em biomedicina) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

MAGAGNIN, C. M. et al. Antifungal susceptibility of dermatophytes isolated from patients with chronic renal failure. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Porto Alegre, v. 86, n. 4, p. 694-701, 2011.

MAHALE, R. P. et al. Clinicomycological profile of Dermatophytosis in a teaching hospital. **International Journal of Pharmaceutical Science Invention**, India, v. 3, n. 8, p. 43-46, Aug. 2014.

MAHIEU, A. et al. On the Polymorphism of Griseofulvin: identification of Two Additional Polymorphs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v. 102, n. 2, p. 462-468, Feb. 2013.

MANZANO-GAYOSSO, P. et al. La resistencia a los antifúngicos: un problema emergente em México. **Gaceta Médica de México**, México, v. 144, n. 1, p. 23-26, 2008.

MARANHÃO, F. C. A. et al. Membrane transporter proteins are involved in *Trichophyton rubrum* pathogenesis. **Journal of Medical Microbiology**, [S.l.], v. 58, n. 2, p. 163-168, Feb. 2009.

MARCHETTI, V. et al. Evaluation of Fungicidal Efficacy of Benzalkonium Chloride (Steramina G u.v.) and Virkon-S against *Microsporium canis* for Environmental Disinfection. **Veterinary Research Communications**, Netherlands, v. 30, p. 255-261, 2006.

MARKIEWICZ, M. **Investigation on the behaviour of imidazolium ionic liquids in the environment**. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia) - Chemical Faculty, Gdańsk University of Technology, Polônia, 2012.

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

MARTINEZ, R. An update on the use of antifungal agents. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Ribeirão Preto, v. 32, n. 5, p. 449-460, 2006.

MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T.; ROSSI, A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 166, n. 6, p. 369-383, May 2008.

MARUYAMA, R. et al. An epidemiological and clinical study of untreated patients with *tinea pedis* within a company in Japan. **Mycoses**, Japão, v. 46, p. 208-212, Oct. 2003.

MATRICCIANI, L.; TALBOT, K.; JONES, S. Safety and efficacy of *tinea pedis* and onychomycosis treatment in people with diabetes: a systematic review. **Journal of Foot and Ankle Research**, [S.l.], v. 4, n. 1, p. 26, Dec. 2011.

MAULINGKAR, S. V.; PINTO, M. J. W.; RODRIGUES, S. A Clinico-Mycological Study of Dermatophytoses in Goa, India. **Mycopathologia**, India, v. 178, p. 297-301, Aug. 2014.

MCCARTHY, J. P. A. et al. NB-002, a Novel Nanoemulsion with Broad Antifungal Activity against Dermatophytes, Other Filamentous Fungi, and *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Texas, v. 53, n. 8, p. 3273-3279, Aug. 2009.

MCCLELLAN, K. J.; WISEMAN, L. R.; MARKHAM, A. Terbinafine. An update of its use in superficial mycoses. **Drugs**, [S.l.], v. 58, n. 1, p. 179-202, July, 1999.

MEDEIROS, F. et al. Dermatofitos – Revisão de literatura. **Revista Científica eletrônica de medicina veterinária**, São Paulo, v. 7, n. 12, p. 1-5, jan. 2009.

MELETIADIS, J. et al. Comparison of NCCLS and 3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazolium Bromide (MTT) Methods of *In Vitro* Susceptibility Testing of Filamentous Fungi and Development of a New Simplified Method. **Journal of Clinical Microbiology**, [S.l.], v. 28, n. 8, p. 2949-2954, Aug. 2000.

MELO-MONTEIRO, C. et al. Kerion Celsi por *Microsporium gypseum*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 3, p. 319-321, jun. 2003.

MENDOZA, M. H. et al. A zoonotic ringworm outbreak caused by a dysgonic strain of *Microsporum canis* from stray cats. **Revista Iberoamericana de Micologia**, Espanha, v. 27, n. 2, p. 62-65, mar. 2010.

MENEGATTI, R.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. A importância da síntese de fármacos. **Cadernos temáticos de química nova na escola**, [S.l.], n. 3, maio 2001.

MESSALI, M. et al. Synthesis, characterization and the antimicrobial activity of new eco-friendly ionic liquids. **Chemosphere**, [S.l.], v. 91, p. 1627-1634, Jan. 2013.

MIAO, Z. et al., Synthesis of polyaniline nanofibrous networks with the AID of na amphiphilic ionic liquid. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, [S.l.], v. 6, n. 1, p. 227-230, 2006.

MIRANDA, M. F. et al. *Microsporum gypseum* infection showing a white-paint-dot appearance. **International Journal of Dermatology**, [S. l.], v. 37, n. 12, p. 956-957, 1998.

MITEVA, M.; TOSTI, A. Hair and scalp dermatoscopy. **Journal of the American Academy of Dermatology**, Florida, v. 67, n.5, p. 1040-1048, Mar. 2012.

MIYAGAWA, S. et al. Subacute cutaneous lúpus erythematosus lesions precipitated by griseofulvin. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [S.l.], v. 21, n. 2, p. 343-436, Aug. 1989.

MONTAGNER, G. F. F. S. et al. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. **Toxicology in Vitro**, [S.l.], v. 24, p. 1410-1416, Apr. 2010.

MOOSSAVI, M.; BAGHERI, B.; SCHER, R. K. Systemic antifungal therapy. **Dermatologic Clinics**, New York, v. 19, n. 1, p. 35-52, Jan. 2001.

MORAES, M. A. et al. Dermatophytic pseudomycetoma: report of a case caused by *Trichophyton tonsurans*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 34, n. 3, p. 291-294, jun. 2001.

MOREIRA, T. M. S. **Estudo da composição química, citotoxicidade e alvos da atividade antifúngica de *Melaleuca alternifolia* Cheel (*Myrtaceae*) e de *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (*Myrtaceae*)**. 158 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2010.

MORIELLO, K. A.; NEWBURY, S. Recommendations for the Management and Treatment of Dermatophytosis in Animal Shelters. **Veterinary Clinics North Small Animal Practice**, [S.l.], v. 36, n. 1, p. 89-114, 2006.

MORRIS, M. I.; VILLMANN, M. Echinocandins in the management of invasive fungal infections, part 1. **American Journal of Health-System Pharmacy**, [S.l.], v. 63, p. 1693-1703, Sept. 2006.

MOYANO, E. G. et al. *Tinea cruris* (glutealis) de importación por *Trichophyton rubrum* var. *raubitschekii* en España. **Revista Iberoamericana de Micología**, Málaga, v. 25, n. 4, p. 250-253, 2008.

MUKHERJEE, P. K. et al. Clinical *Trichophyton rubrum* strain exhibiting primary resistance to terbinafine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Austria, v. 47, n. 1, p. 82-86, Jan. 2003.

MUKHOPADHYAY, D. K. et al. Evaluation of *in vivo* genotoxicity of cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline comet assay. **Mutagenesis**, [S.l.], v. 19, n. 2, p. 85-90, 2004.

MUÑOZ-BONILLA, A.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, M. Polymeric materials with antimicrobial activity. **Progress in Polymer Science**, Espanha, v. 37, p. 281-339, 2012.

MYCOLOGY ONLINE – National Mycology Reference Centre. Disponível em: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/>. Acesso em: 17 out. 2014.

NATESAN, S. K. et al. Fluvastatin potentiates the activity of caspofungin against *Aspergillus fumigatus in vitro*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, USA, v. 60, n. 4, p. 369-373, Apr. 2008.

N'DIAYE, B. et al. Clinical efficacy and safety of oral terbinafine in fungal mycetoma. **International Journal of Dermatology**, [S.l.], v. 45, n. 2, p. 154-157, Feb. 2006.

NERI, I. et al. *Tinea capitis* y dermatoscopia. **Anales de Pediatría**, Espanha, v. 81, n. 1, p. 53-54, 2014.

NIEBOER, C. et al. Incidence of *tinea pedis* in industrial workers using common shower rooms. **British Journal of Industrial Medicine**, [S.l.], v. 117, p. 794-795, 1987.

ODSS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal agents: mechanisms of action. **TRENDS in Microbiology**, [S.l.], v. 11, n. 6, p. 272-279, 2003.

ODZAKA, R.; SKOCIBUSIC, M.; MARAVIC, A. Synthesis and antimicrobial profile of N-substituted imidazolium oximes and their monoquaternary salts against multidrug resistant bacteria. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Croacia, v. 21, n. 23, p. 7499-7506, Sept. 2013.

OLIVEIRA, J. C. **Diagnóstico Micológico por Imagens-Um Guia para o Laboratório de Micologia Médica**. 1. ed., Rio de Janeiro: J. Carvalhaes de Oliveira, 2014.

OLIVIER-BOURBIGOU, H.; MAGNA, L.; MORVAN, D. Ionic liquids and catalysis: Recent progress from knowledge to applications. **Applied Catalysis A: General**, França, v. 373, p. 1-56, 2010.

OSBORNE, C. S. et al. Amino Acid Substitution in *Trichophyton rubrum* Squalene Epoxidase Associated with Resistance to Terbinafine. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Austria, v. 49, n. 7, p. 2840-2844, July 2005.

OUF, S. A. et al. Efficacy of some synthesized thiazoles against dermatophytes. **Journal de Mycologie Médicale**, Arábia Saudita, v. 23, n. 4, p. 230-236, Oct. 2013.

OYECA, C. A. *Trichophyton mentagrophytes*: a keratinophilic fungus. In.: Biology of dermatophytes and other keratinolytic fungi. **Revista Iberoamericana de Micologia**, Espanha, v.17, p. 60-65, 2000.

PARK, B. J. et al. *In Vitro* Antifungal Activity of Epigallocatechin 3-O-Gallate against Clinical Isolates of Dermatophytes. **Yonsei Medical Journal**, Japão, v. 52, n. 3, p. 535-538, May 2011.

PARKER, J. E. et al. Resistance to antifungals that target CYP51. **Journal of Chemical Biology**, Swansea, v. 7, p. 143-161, Aug. 2014.

PEI-LAN, S.; LI-MIN H.; PO-REN, H. Recent advances and challenges in the treatment of invasive fungal infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [S.l.], v. 30, n. 6, p. 487-495, Oct. 2007.

PERARO, A. C. **Estabilidade física e metodologia analítica para formulações farmacêuticas contendo cetoconazol**. 128 f. Dissertação (Mestrado em produção e controle farmacêuticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

PERCA, S. et al. Prevalence and risk factors of *tinea unguium* and *tinea pedis* in the general population in Spain. **Journal of Clinical Microbiology**, Espanha, v. 38, n. 9, p. 3226-3230, Sept. 2000.

PEREIRA, D. I. B. et al. Dermatofitose suína causada por *Trichophyton mentagrophytes* – Relato de caso. **Revista da FZVA**, Uruguaina, v.11, n.1, p. 140-145, 2004.

PEREIRA, D. I. B. et al. Surto de *Trichophyton equinum* var. *equinum* em equinos no Sul do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1849-1853, dez. 2006.

PEREIRA, F. O. et al. Effects of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor essential oil on the growth and morphogenesis of *Trichophyton mentagrophytes*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, João Pessoa, v. 47, n. 1, p. 145-153, Mar. 2011.

PEREIRA, C. A. et al. Análise das principais micoses encontradas na rotina de um laboratório de análises clínicas na cidade de Jataí, estado de Goiás, Brasil. **SaBios - Revista de Saúde e Biologia**, Goiás, v. 9, n. 1, p. 108-114, abr. 2014.

PERES, N. T. A. et al. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Ribeirão Preto, v. 85, n. 5, p. 657-667, 2010.

PÉREZ-GONZALÉZ, M. et al. Prevalence of *tinea pedis*, *tinea unguium* of toenails and *tinea capitis* in school children from Barcelona. **Revista Iberoamericana de Micología**, Espanha, v. 26, n. 4, p. 228-232, Sept. 2009.

PERNAK, J.; SOBASZKIEWICZ, K.; MIRSKA, I. Anti-microbial activities of ionic liquids. **Green Chemistry**, Polônia, v. 5, p. 52-56, 2003.

PETRANYI, G.; RYDER, N. S.; STUTZ, A. Allylamine derivatives: new class of synthetic antifungal agents inhibiting fungal squalene epoxidase. **Science**, [S.I.], v. 224, n. 4654, p. 1239-1241, June 1984.

PETROVIC, Z. D. et al. Antimicrobial activity of the ionic liquids triethanolamine acetate and diethanolamine chloride, and their corresponding Pd(II) complexes. **Journal of Molecular Liquids**, Sérvia, v. 170, p. 61-65, Mar. 2012.

PIHET, M. et al. Isolation of *Trichophyton concentricum* from chronic cutaneous lesions in patients from the Solomon Islands. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, França, v. 102, p. 389-393, Jan. 2008.

PINTO, V. et al. Kerion of the vulva report of a case and review of the literature. **Minerva ginecol**, [S.I.], v. 45, n. 10, p. 501-505, Oct. 1993.

PINTO, E. et al. Antifungal activity of xanthenes: evaluation of their effect on ergosterol biosynthesis by high-performance liquid chromatography. **Chemical Biology & Drug Design**, [S.I.], v. 77, n. 3, p. 212-22, Mar. 2011.

PIRES, C. A. A. et al. Clinical, epidemiological, and therapeutic profile of dermatophytosis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Belém, v. 89, n. 2, p. 259-264, Feb. 2014.

PLECHKOVA, N. V.; SEDDON, K. R. Applications of ionic liquids in the chemical industry. **Chemical Society Reviews**, [S.I.], v. 37, n. 1, p. 123-150, 2008.

POLILLI, E. et al. *Tinea incognita* caused by *Microsporum gypseum* in a patient with advanced HIV infection: A case report. **Case Reports in Dermatology**, [S.I.] v. 3, p. 55-59, 2011.

PORCHE, D. J. *Tinea pedis*: A Common Male Foot Problem. **The Journal for Nurse Practitioners**, p. 152-153, Mar. 2006.

PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA. ***Epidermophyton floccosum*, *Microsporum spp.*, *Trichophyton spp.***, 2010. Disponível em: <<http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/epidermophyton-eng.php>>. Acesso em: 27 out. 2014.

QUINN, P. J. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. 1. ed. São Paulo: Artmed, 2002.

RAJPUT, S. B. et al. Anti-*Candida* properties of asaronaldehyde of *Acorus gramineus* rhizome and three structural isomers. **Chinese Medicine**, [S.I.], v. 8, n. 18, p. 2-8, 2013.

RANKE, J. et al. Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute *Vibrio fischeri* and WST-1 cell viability assays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Alemanha, v. 58, n. 3, p. 396-404, July 2004.

REBOLLO, N.; LÓPEZ-BARCENAS, A. P.; ARENAS, R. Tiña de la cabeza. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, México, v. 99, n. 2, p. 91-100, 2008.

REFAI, M.; EL-YAZID, H. A.; EL-HARIRI, M. **Monograph On Dermatophytes: A guide for isolation and identification of dermatophytes, diseases and treatment**. 73 f. Monografia - Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University, Egito, 2013.

RESENDE, M. A. **Dermatofitoses: gêneros, principais espécies antropofílicas, diagnóstico laboratorial e tratamento**. 54 f. Monografia (Especialização) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

REZENDE, C. et al. Estudo epidemiológico das dermatofitoses em instituições públicas da cidade de Barretos, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 13-16, maio 2008.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. 1ª ed. Canoas: Editora Ulbra, 2003.

RIDUAN, S. N.; ZHANG, Y. Imidazolium salts and their polymeric materials for biological applications. **Chemical Society Reviews**, [S.I.], v. 42, n. 23, p. 9055-9070, May 2013.

RITTER, S. K. New Chains For Ionic Liquids. **C&EM – Chemistry in pictures**, [S.I.], v. 88, n. 11, p. 11, Mar. 2010. Disponível em: < <http://cen.acs.org/articles/88/i11/New-Chains-Ionic-Liquids.html> >. Acesso em: 06 nov. 2014.

ROBINSON, R. Antifungal Fluconazole Induces Aneuploidy, Sowing the Seeds of Its Own Failure. **PLOS Biology**, USA, v. 12, n. 3, p. e1001816, Mar. 2014.

ROCHA, D.; VIEIRA, F. A. S. Levantamento Epidemiológico de Infecções Fúngicas de Pacientes Atendidos em um Laboratório da Região do Vale dos Sinos, RS. **NewsLab**, Rio Grande do Sul, v. 121, p. 100-108, 2014.

ROCHETTE, F.; ENGELEN, M.; BOSSCHE, H. Antifungal agents of use in animal health – practical applications. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, [S.I.], v. 26, n. 1, p.31-53, 2003.

RODRIGUES, G. S. et al. *Tinea capitis* em adulto por *Trichophyton violaceum* no Brasil: relato de um caso e revisão da literatura. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Itajaí, v. 83, n. 6, p. 544-548, 2008.

RODRIGUES, F. **Espectroscopia Raman de Líquidos Iônicos Imidazólicos: Interações Interiônicas, Organização Estrutural e Efeitos de Micro-ambiente**. 173 f. Tese (Doutorado em Físico-química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

ROMAGNOLI, C. et al. Antifungal activity of 5 new synthetic compounds vs. *Trichophyton rubrum* and *Epidermophyton floccosum*. **Mycopathologia**, [S.l.], v. 153, n. 3, p. 129-132, 2002.

ROSSI, D. et al. Antidermatophytic activity of pyrazolo[3,4-c]isothiazoles: a preliminary approach on 4-chlorophenyl derivative for evaluation of mutagenic and clastogenic effects on bacteria and human chromosomes *in vitro*. **Drug and Chemical Toxicology**, [S.l.], v. 34, n. 3, p. 324-331, 2011.

RUBIO, M. C. et al. Perspectiva micológica de los dermatofitos en el ser humano. **Revista Iberoamericana de Micología**, Espanha, v. 16, p. 16-22, 1999.

SAENZ, F. J. Identificación de hongos dermatofitos. **Revista Iberoamericana de Micología**, Espanha, p.1-12, 2001.

SANTOS, J. I. et al. Some aspects of dermatophytoses seen at University Hospital in Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 137-140, June 1997.

SATO, B. M. **Síntese e propriedades de líquidos iônicos e tensoativos**. 166 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, [S.l.], v. 31, n. 1, p. 9-15, Feb. 1975.

SCHREKKER, H. S. et al. Preparation, Cation-Anion Interactions and Physicochemical Properties of Ether-Functionalized Imidazolium Ionic Liquids. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Porto Alegre, v. 19, n. 3, p. 426-433, 2008.

SCHREKKER, H. S. et al. Imidazolium salts as antifungal agents: activity against emerging yeast pathogens, without human leukocyte toxicity. **Medicinal Chemistry Communications**, Porto Alegre, v. 4, p. 1457-1460, Sept. 2013.

SEEBACHER, C.; BOUCHARA, J.; MIGNON, B. Updates on the Epidemiology of Dermatophyte Infections. **Mycopathologia**, Alemanha, v. 166, n. 6, p. 335-352, May 2008.

SEYMOR, M. D. R. Overview: The treatment of dermatophytosis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, Washington, v. 43, n. 5, p. S104-112, Nov. 2000.

SHEIKH, A. R. et al. Interaction of Terbinafine (Anti-fungal agent) with Perhexiline: A Case Report. **Heart, Lung and Circulation**, [S.l.], v. 23, n. 6, p. e149-e141, June 2014.

SHEMER, A. et al. Ciclopirox nail lacquer for the treatment of onychomycosis: an open non-comparative study. **The Journal of Dermatology**, [S.l.], v. 37, n. 2, p. 137-139, Feb. 2010.

SHEMER, A. et al. Clinical comparison and complete cure rates of terbinafine efficacy in affected onychomycotic toenails. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, doi: 10.1111/jdv.12609, 2014.

SHEN, T.; ZHOU, H.; HUANG, S. The anticancer mechanisms of ciclopirox olamine. **Cancer Research**, Washington, v. 73, n. 8, p. 3408, Apr. 2013.

SHI, T. et al. Combination treatment of oral terbinafine with topical terbinafine and 10% urea ointment in hyperkeratotic type *tinea pedis*. **Mycoses**, China, v. 57, p. 560-564, 2014.

SHIVAKUMAR, V. et al. Intermittent pulse-dosed terbinafine in the treatment of *tinea corporis* and/or *tinea cruris*. **Indian Journal of Dermatology**, v. 56, n. 1, p. 121-122, Feb. 2011.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SILVA, I. V. et al. Dois casos de Quérion por *Trichophyton mentagrophytes*. **NASCER E CRESCER-revista de pediatria do centro hospitalar do porto**, Lisboa, v. 21, n. 4, p. 237-240, dez. 2012.

SIMONETTI, O. et al. *In vitro* activity of Tachyplesin III alone and in combination with terbinafine against clinical isolates of dermatophytes. **Peptides**, [S.l.], v. 30, n. 10, p. 1794-1797, Oct. 2009.

SIMONETTI, O. et al. *In vitro* activity of the protegrin IB-367 alone and in combination compared with conventional antifungal agents against dermatophytes. **Mycoses**, Polônia, v. 57, n. 4, p. 233-239, Apr. 2014.

SIMPANYA, M. F. Dermatophytes: Their taxonomy, ecology and pathogenicity. **Revista Iberoamericana de Micología**, Espanha, p. 1-12, 2000.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, [S.l.], v. 175, n. 1, p. 184-191, Mar. 1988.

SINSKI, J. T.; KELLEY, L. M. A survey of dermatophytes isolated from patients in the United States from 1982 to 1984. **Mycopathologia**, Estados Unidos, v. 98, n.5, p.35-40, Apr. 1987.

SIONOV, E. et al. Antifungal effect and possible mode of activity of a compound from the marine sponge *Dysidea herbacea*. **Journal of Infection**, [S.l.], v. 50, n. 5, p. 453-460, June 2005.

SIQUEIRA, E. R. et al. Occurrence of dermatophyte, in nails, feet and hands of university students. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Ribeirão Preto, v. 39, n. 3, p. 269-271, June 2006.

SPIEWAK, R.; SZOSTAK, W. Zoophilic and geophilic dermatophytoses among farmers and non-farmers in Eastern Poland. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, Polônia, v. 7, n. 2, p. 125-129, Oct. 2000.

SPIVAK, G.; COX, R. A.; HANAWALT, P. C. New applications of the Comet assay: Comet-FISH and transcription-coupled DNA repair. **Mutation Research**, [S.l.], v. 681, n. 1, p. 44-50, Feb. 2008.

SOARES, C. B. et al. Household cluster of *tinea capitis* caused by *Trichophyton violaceum* in Brazil. **International Journal of Dermatology**, [S.l.], v. 42, n. 8, p. 666-667, Aug. 2003.

SOARES, L. A. et al. Anti dermatophytic therapy - Prospects for the discovery of new drugs from natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S.l.], v. 44, n. 4, p. 1035-1041, Dec. 2013.

SOLOMON, E.; BERG, L.; MARTIN, D. **Biology**. 6. ed. Brooks: Cole Publishing. 2002.

SUBISSI, A. et al. Ciclopirox: recent nonclinical and clinical data relevant to its use as a topical antimycotic agent. **Drugs**, [S.l.], v. 70, n. 16, p. 2133-2152, Nov. 2010.

SUGAR, A. M. et al. Pharmacology and Toxicity of High-Dose Ketoconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Boston, v. 31, n. 12, p. 1874-1878, Dec. 1987.

SYMOENS, F. O. et al. Molecular analysis and mating behaviour of the *Trichophyton mentagrophytes* species complex. **International Journal of Medical Microbiology**, [S.l.], v. 301, n. 3, p. 260-266, Mar. 2011.

TAO-XIANG, N. et al. Analysis of dermatomycoses in Lanzhou district of northwestern China. **Mycopathologia**, [S.l.], v. 160, n. 4, p. 281-284, Nov. 2005.

TAUBER, A.; MULLER-GOYMANN, C. Comparison of the Antifungal Efficacy of Terbinafine Hydrochloride and Ciclopirox Olamine Containing Formulations against the Dermatophyte *Trichophyton rubrum* in an Infected Nail Plate Model. **Molecular Pharmaceutics**, Alemanha, v. 11, n. 7, p. 1991-1996, July 2014.

TAVARES, H. S.; ALCHORNE, M. M. A.; FISCHMAN, O. *Tinea cruris* epidemiology (São Paulo, Brazil). **Mycopathologia**, São Paulo, v. 149, p.147-149, Sept. 2000.

TAYLOR, C.; GURR, S. Fungal pathogenesis: Past, present and future. **Fungal Biology Reviews**, Reino Unido, v. 28, p. 24-28, 2014.

TEIXEIRA, G. P. G.; GRIPP, A. C. Frequency of dermatoses in pediatric in patients at Hospital Universitário Pedro Ernesto. **Revista HUPE**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 1, p. 28-39, Ago. 2014.

THOMAS, J. et al. Toenail onychomycosis: an important global disease burden. **Journal of Clinical Pharmacology**, [S.I.], v. 35, n. 5, p. 497-519, Oct. 2010.

THOMAS, P. et al. The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. **Mutation Research**, [S.I.], v. 638, n. 1-2, p. 37-47, Feb. 2008.

TORRES, B. F. **Sensibilidad antifúngica de lós dermatofitos**. 119 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Espanha, 2005.

TROTHA, R. et al. *Tinea barbae* caused by a zoophilic strain of *Trichophyton interdigitale*. **Mycoses**, Califórnia, v. 46, n. 1-2, p. 60-63, Feb. 2003.

TSUNEMI, Y. et al. Screening for *tinea unguium* by Dermatophyte Test Strip. **British Journal of Dermatology**, Japão, v. 170, n. 2, p. 328-331, Feb. 2014.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. **Recomendações para elaboração de teses e dissertações**, 2011. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/ppgcf/sites/default/files/documentos/Recomenda%C3%A7%C3%B5es%20para%20Elabora%C3%A7%C3%A3o%20de%20Teses%20e%20Disserta%C3%A7%C3%B5es.pdf>>. Acesso em: Oct. 2014.

VANDER, S. M. R.; HOSSAIN, M. A.; GHANNOUM, M. A. Cutaneous infectious dermatophytosis, onychomycosis, and *tinea versicolor*. **Infectious Disease Clinics of North America**, [S.I.], v. 17, n. 1, p. 87-112, Mar. 2003.

VANHOOTEGHEM, O. et al. Chronic interdigital dermatophytic infection: A common lesion associated with potentially severe consequences. **Diabetes Research and Clinical Practice**, Bélgica, v. 91, n. 1, p. 23-25, Jan. 2011.

VENA, G. A. et al. Epidemiology of dermatophytoses: retrospective analysis from 2005 to 2010 and comparison with previous data from 1975. **New Microbiologica**, [S.I.], v. 35, n. 2, p. 207-13, Mar. 2012.

VETTORATO, G. et al. Frequência de dermatoses infecciosas em 208 pacientes transplantados renais. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 3, p. 283-288, jun. 2003.

VLAHAKIS, J. Z. et al. Anti-*Plasmodium* activity of imidazolium and triazolium salts. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Canadá, v. 18, n. 16, p. 6184-6196, Aug. 2010.

WAGNER, G.; SACHSE, M. M. Arzneimittelinduzierter subakuter kutaner Lupus erythematodes: Wiederholtes Auftreten nach Einnahme von Terbinafin. **Hautarzt**, [S.l.], v. 65, n. 6, p. 548-552, Jan. 2014.

WAKELIN, S. H.; MAIBACH, H. I. **Handbook of Systemic Drug Treatment in Dermatology**. 1. ed. London: Manson Publishing Ltd., 2003.

WANG, H.; MALHOTRA, S. V.; FRANCIS, A. J. Toxicity of various anions associated with methoxyethyl methyl imidazolium-based ionic liquids on *Clostridium* sp. **Chemosphere**, USA, v. 82, p. 1597-1603, 2011.

WANG, C. et al. Comparative antioxidant status in freshwater fish *Carassius auratus* exposed to eight imidazolium bromide ionic liquids: A combined experimental and theoretical study. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S.l.], v. 102, p. 187-195, Apr. 2014.

WASSERSCHIED, P.; WELTON, T. **Ionic Liquids in Synthesis**. 2. ed. Germany: Weinheim. 2008.

WATANABE, S. et al. An epidemiological study to assess the prevalence of *tinea pedis* et unguium in Japan. **Japanese Journal of Dermatology**, Japão, v. 111, p. 2101-2112, 2001.

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

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

WHO (2014) World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>>. Acesso em: 14 out. 2014.

WILSON, R. M.; DANISHEFSKY, S. J. Small molecule natural products in the discovery of therapeutic agents: the synthesis connection. **The Journal of Organic Chemistry**, [S.l.], v. 71, n. 22, p. 8329-8351, Oct. 2006.

WOLFF, K.; JOHNSON, R. A.; SAAVEDRA, A. P. **Dermatologia de Fitzpatrick – atlas e texto**. 7. ed. New York: Artmed, 2013.

WOONG CHO, C. et al. Toxicity of imidazolium salt with anion bromide to a phytoplankton *Selenastrum capricornutum*: Effect of alkyl-chain length. **Chemosphere**, Korea, v. 69, n. 6, p. 1003-1007, Oct. 2007.

WOREK, M. et al. Identification of dermatophyte species using genomic *in situ* hybridization (GISH). **Journal of Microbiological Methods**, Polônia, v. 100, p. 32-41, May 2014.

WU, S. X. et al. Human pathogenic fungi in China-emerging trends from ongoing national survey for 1986, 1996, and 2006. **Mycopathologia**, [S.l.], v. 171, n. 6, p. 387-393, June 2011.

YAMAGUCHI, M. U. et al. Effects of a Thiosemicarbazide Camphene Derivative on *Trichophyton mentagrophytes*. **Molecules**, [S.I.], v. 14, n. 5, p. 1796-1807, May 2009.

YAN, J.; WANG, X.; CHEN, S. Systematic review of severe acute liver injury caused by terbinafine. **International Journal of Clinical Pharmacy**, China, v. 36, n. 4, p. 679-683, Aug. 2014.

YU, C.; ZHOU, J.; LIU, J. *Tinea incognito* due to *Microsporum gypseum*. **Journal of Biomedical Research**, China, v. 24, n. 1, p. 81-83, Nov. 2010.

YUNIS, J. J. High resolution of human chromosomes. **Science**, [S.I.], v. 191, n. 4233, p. 1268-1270, Mar. 1976.

ZENG, X. et al. Synthesis and antitumor activity of 1-mesityl-3-(2-naphthoylemethano)-1H-imidazolium bromide. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, China, v. 20 p. 1844-1847, Feb. 2010.

ZHAN, P. et al. The Epidemiology of *tinea manuum* in Nanchang Area, South China. **Mycopathologia**, China, v. 176, n. 2, p. 83-88, Aug. 2013.

ZHANG, C. et al. A class of imidazolium salts is anti-oxidative and anti-fibrotic in hepatic stellate cells. **Free Radical Research**, [S.I.], v. 43, n. 10, p. 899-912, Aug. 2009.

ZHAO, D. B.; LIAO, Y. C.; ZHANG, Z. D. Toxicity of ionic liquids. **Clean-Soil Air Water**, [S.I.], v. 35, n. 1, p. 42-48, Feb. 2007.

ZHAO, L. et al. Imidazolium Salts: A Mild Reducing and Antioxidative Reagent. **Journal of the American Chemical Society**, Singapura, v. 130, n. 38, p. 12586-12587, Aug. 2008.

ZIEMER, M. et al. Atypical manifestations of *tinea corporis*. **Mycoses**, Alemanha, v. 50, n. 2, p. 31-35, Apr. 2007.