



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE

CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE

UNIDADE ACADÊMICA DE SAÚDE

CURSO BACHARELADO EM FARMÁCIA

GUSTAVO NUNES CARDOSO

**DERMATÓFITOS DESENVOLVEM RESISTÊNCIA AOS MONOTERPENOS
GERANIOL E CITRONELOL**

CUITÉ – PB

2017

GUSTAVO NUNES CARDOSO

**DERMATÓFITOS DESENVOLVEM RESISTÊNCIA AOS MONOTERPENOS
GERANIOL E CITRONELOL**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à coordenação de Farmácia da
Universidade Federal de Campina Grande
– UFCG/CES como parte dos requisitos
para obtenção do título de Bacharel em
Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira

CUITÉ – PB

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE
Responsabilidade Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

C268d Cardoso, Gustavo Nunes.

Dermatófitos desenvolvem resistência aos monoterpenos geranial e citronelol. / Gustavo Nunes Cardoso. – Cuité: CES, 2017.

45 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Farmácia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2017.

Orientador: Fillipe de Oliveira Pereira.

1. Antifúngico. 2. Resistência. 3. Dermatófitos. I. Título.

Biblioteca do CES - UFCG

CDU 635.8

GUSTAVO NUNES CARDOSO

**DERMATÓFITOS DESENVOLVEM RESISTÊNCIA AOS MONOTERPENOS
GERANIOL E CITRONELOL**

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Farmácia da Universidade Federal de Campina Grande UFCG/CES, como requisito à obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira

Aprovado em: 01 de novembro de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Profº Dr. Fillipe de Oliveira Perreira
(Orientador)

Profº Me. Michael Radan de Vasconcelos Marques

Profº Dr. Egberto Santos Carmo

Dedico esse trabalho a Deus. A minha família, especialmente a meus avós Joana e Francisco, e a minha mãe Elieuzza, por todo o apoio e incentivo em todos os momentos desta longa jornada, onde nunca mediram esforços para que eu a concluísse.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado força e coragem pra enfrentar todas as dificuldades, a distância de casa, a saudade da família e amigos e todos os desafios durante esses cinco anos.

A minha avó, Joana Lopes que sempre me apoiou durante toda minha vida, me incentivou e me deu forças em todos os momentos e meu avô Francisco Ferreira (Chico de Alfredo) (*In memoriam*) que foi minha fortaleza e apoio a todo o momento, mas que infelizmente não está mais conosco para desfrutar dessa imensa alegria que ajudou a construir, sei que onde ele estiver sempre irá me proteger e com certeza estará comemorando essa nossa vitória (*in memoriam*). A minha mãe Elieuzza Nunes que nunca mediu esforços para me ajudar, sempre esteve ao meu lado dando forças, e sempre me apoiando. Vocês me ensinaram de tudo na vida, educação, coragem pra enfrentá-la e o principal, o caráter, amo vocês, essa vitória é nossa.

Ao meu pai José Jarbas por todo o apoio durante esses cinco anos. Aos meus tios, Adalberto, Gilberto, Carlos, Marleuza, Tereza, obrigado por todas as palavras de incentivo.

A minha namorada Sabrina Alencar, por aguentar meu estresse todo esse tempo e pelo grande apoio, carinho e atenção em todos os momentos que precisei, muito obrigado.

Aos meus amigos/irmãos da casa dos artistas, Wendeberto, Emanuel, Kaltz, Guilherme, Fernando, Lucas, Valmir e Michel, vocês foram essências durante esses anos, obrigado por me acolherem, por serem família, pelas noites de risadas, divertimento e comidas, e por todo apoio nos momentos difíceis, que como sabemos foram vários.

Agradeço a outra grande família que construí em Cuité, a velha “irmandade”, Hugo, Andressa, Sthefane, Samara, Patricia e Kaltz, sempre juntos nas horas boas e ruins, hoje sei que posso contar com vocês para tudo. Sem esquecer Ericlebson, Maciel, Ana Carolina, Nelly, Geofrancis, Bruna, Leticia, Camila e Grazi sei que também posso contar com vocês.

E a melhor turma de todas, a turma XI de Farmácia “Os Canxa” que mesmo com as brigas sempre estivemos juntos.

Aos meus grandes amigos de Riacho de Santana em especial, Acassio, Albino, Alex, Alexandre, Bruno, Iranildo, Douglas, Vaneudo, Vitoria, Gilberlândio, Marcos, Mateus, Kairo, Julio, Jaiane, Junior, Jutahy, Jorge Vinicios, Leonardo, Jessé. O apoio de vocês mesmo de longe foi fundamental, obrigado.

A todos os professores do curso de Farmácia do CES/UFCG, que foram os maiores responsáveis por eu estar concluindo esta etapa da minha vida, por me proporcionar o

conhecimento no processo de formação profissional. Em especial ao Prof. Dr. Fernando Oliveira, que foi fundamental na minha formação desde a Farmacologia I, posteriormente sendo meu orientador em monitoria e extensão, um grande amigo que construí.

Ao grupo de pesquisa GPFungos (Islaine, Helen, Mara, Prof^o Fillipe) que teve grande participação na minha vida acadêmica, muito obrigado a vocês.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fillipe de Oliveira, por toda paciência, por acreditar em mim e está até hoje me orientando, desde PIVIC em 2015. Agradeço por toda a sabedoria repassada, obrigado pelos ensinamentos e dedicação que sempre teve, e além de excelente profissional, um grande amigo.

RESUMO

As dermatofitoses são infecções fúngicas em tecidos queratinizados como unhas, cabelos e estrato córneo da pele, produzidas por fungos denominados dermatófitos, cujo tratamento tem sido motivo de muita preocupação em todo o mundo. Esse fato é justificado pelo aparecimento de cepas resistentes aos principais antifúngicos empregados na terapêutica clínica, como os compostos azólicos. No entanto, são escassos os estudos que evidenciem a capacidade dos dermatófitos em desenvolver resistência, após prolongada exposição a produtos naturais, incluindo-se os terpenos. Geraniol e citronelol são monoterpenos com potencial antifúngico reconhecido. Este estudo investigou a capacidade de cepas de dermatófitos (*Trichophyton rubrum* LM 305, *Microsporum canis* LM 216 e *Microsporum gypseum* LM 305) adquirirem resistência aos monoterpenos citronelol e geraniol, e se essa resistência ocorreria de maneira cruzada entre os próprios monoterpenos, e com os fármacos azólicos cetoconazol, fluconazol e itraconazol. Em seguida, foi verificada a estabilidade dessa resistência. Inicialmente, foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) dos monoterpenos e dos fármacos azólicos pelo método de microdiluição. Posteriormente, foi feita a adaptação das cepas submetidas a 8 subcultivos sucessivos em ágar Sabouraud dextrose contendo concentrações subinibitórias de citronelol e geraniol. Após este período de adaptação, foi realizada a microdiluição das drogas para verificar mudanças nos valores iniciais de CIM. Por fim, procedeu-se à avaliação da estabilidade da resistência, após 8 passagens em tubos apenas com o meio de cultura livre de drogas, determinando CIM também por microdiluição. Os resultados demonstram que houve alteração nas CIM iniciais dos azólicos e dos produtos naturais (cetoconazol 1,1,1 (µg/mL); fluconazol 2,2,2 (µg/mL); itraconazol 1, 1, 1(µg/mL); citronelol 64 ,256 ,256 (µg/mL) e geraniol 64, 128, 128(µg/mL)) para as cepas de *T. rubrum*, *M. canis* e *M. gypseum* respectivamente. Com isso observou-se que os dermatófitos são capazes de adquirir resistência aos monoterpenos, e essa resistência ocorre de forma cruzada com os compostos azólicos e também entre citronelol e geraniol. Por último, os fungos reverteram seu perfil de resistência aos produtos naturais quando cultivados na ausência das drogas, porém para os azólicos não foi observada reversibilidade da resistência. Com isso, podemos ainda colocar o citronelol e o geraniol como possíveis alternativas terapêuticas, embora sejam necessários estudos clínicos controlados para definir a verdadeira eficácia, pois eles conseguiram ser eficazes contra cepas desabitoadas, onde aos azólicos as cepas dermatofíticas permaneceram resistentes.

Palavras-chave: resistência, antifúngico, dermatófitos, monoterpenos, azóis.

ABSTRACT

Dermatophytoses are fungal infections in keratinized tissues such as nails, hairs and stratum corneum of the skin, produced by fungi called dermatophytes, the treatment of which has been a cause of great concern all over the world. This fact is justified by the appearance of strains resistant to the main antifungal agents used in clinical therapy, such as azole compounds. However, there are few studies that demonstrate the ability of dermatophytes to develop resistance after prolonged exposure to natural products, including terpenes. Geraniol and citronellol are monoterpenes with recognized antifungal potential. This study investigated the ability of dermatophyte strains (*Trichophyton rubrum* LM 305, *Microsporum canis* LM 216 and *Microsporum gypseum* LM 305) to acquire resistance to the monoterpenes citronellol and geraniol, and whether this resistance would occur cross-link between the monoterpenes themselves and with the drugs Azole ketoconazole, fluconazole and itraconazole. The stability of this resistance was then verified. Initially, the minimum inhibitory concentration (MIC) of the monoterpenes and azole drugs was determined by the microdilution method. Subsequently, the strains were submitted to 8 successive subcultures on Sabouraud dextrose agar containing subinhibitory concentrations of citronellol and geraniol. After this adaptation period, the microdilution of the drugs was performed to verify changes in the initial MIC values. Finally, the stability of the resistance was evaluated after 8 passages in tubes only with the drug-free culture medium, determining MIC also by microdilution. The results show that there was a change in the initial MICs of azole and natural products (ketoconazole 1,1,1 ($\mu\text{g} / \text{mL}$), fluconazole 2,2,2 ($\mu\text{g} / \text{mL}$), itraconazole 1,1,1 ($\mu\text{g} / \text{mL}$), Citronellol 64, 256, 256 ($\mu\text{g} / \text{mL}$) and geraniol 64, 128, 128 ($\mu\text{g} / \text{mL}$) for the strains of *T. rubrum*, *M. canis* and *M. gypseum* respectively. It was observed that dermatophytes are capable of acquiring resistance to monoterpenes, and this resistance occurs cross-linking with azole compounds and also between citronellol and geraniol. Finally, fungi reversed their profile of natural resistance when cultivated in the absence of drugs, since the azole resistance reversibility was not observed. Therefore, citronellol and geraniol may be considered as possible therapeutic alternatives, although controlled clinical studies are necessary to define the true efficacy, since they have been able to be effective against unlabeled strains, where the azole strains have remained resistant.

Keywords: resistance, antifungal, dermatophytes, monoterpenes, azoles.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: <i>Tinea capitis</i>	17
Figura 2: <i>Tinea corporis</i>	17
Figura 3: <i>Tinea unguium</i>	18
Figura 4: Cepa caracterizando as espécies de fungos dermatófitos.....	21
Figura 5: Estrutura química dos compostos azólicos.....	22
Figura 6: Estrutura química dos monoterpenos citronelol e geraniol.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Valores de concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) das drogas-teste sobre cepas de dermatófitos.....	30
Tabela 2– Sensibilidade de cepas de dermatófitos após indução de resistência antifúngica na presença de citronelol e geraniol.....	32
Tabela 3– Reversão da resistência fúngica das cepas Dermatofíticas em meios de cultura isentos de drogas.....	36

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µg	Microgramas
µL	Microlitros
AB	Ágar batata
ABC	Transportadores de cassete de ATP
ASD	Ágar Sabouraud dextrose
CES	Centro de Educação e Saúde
CIM	Concentração inibitória mínima
CIM/2	Concentração subinibitória
DMSO	Dimetilsulfóxido
FLZ	Fluconazol
ITZ	Itraconazol
LB	Luria-Bertani
LM	Laboratório de micologia
mL	Mililitros
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
UAS	Unidade Acadêmica de Saúde
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	Objetivo geral	15
2.2	Objetivos específicos	15
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
3.1	Dermatofitoses e dermatófitos	16
3.2	Tratamento farmacológico e resistência.....	21
3.3	Terpenos.....	24
4	METODOLOGIA	26
4.1	Local de trabalho	26
4.2	Drogas-teste	26
4.3	Cepas fúngicas	26
4.4	Meios de cultura.....	26
4.5	Inóculo	27
4.6	Determinação da concentração inibitória mínima	27
4.7	Indução de resistência antifúngica	28
4.8	Avaliação da resistência cruzada	28
4.9	Avaliação da estabilidade da resistência.....	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	30
6	CONCLUSÕES	38
7	REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

As dermatofitoses são infecções fúngicas em tecidos queratinizados como unhas, cabelos e estrato córneo da pele, produzidas por fungos denominados dermatófitos. A expressão dermatófitos é utilizada para designar um grupo de fungos queratinofílicos, taxonomicamente relacionados, que ocasionam essas micoses. Embora não façam parte da microbiota do sistema tegumentar, os dermatófitos utilizam a queratina como fonte nutricional de carbono, enxofre e nitrogênio. Esse grupo de fungos compreende diversas espécies, agrupadas em três gêneros: *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton* (LACAZ et al., 2002).

O tratamento das dermatofitoses tem sido motivo de muita preocupação em todo o mundo. Esse fato é justificado pelo aumento da prevalência dessas doenças no cenário mundial e principalmente pelo aparecimento de cepas resistentes aos principais antifúngicos empregados na terapêutica clínica. Alguns agentes se destacam na utilização clínica para o tratamento das dermatofitoses, entre os quais existem os fármacos imidazólicos como o cetoconazol e os compostos triazólicos, a exemplo do itraconazol e fluconazol (FERNÁNDEZ-TORRES et al., 2003).

O aumento da resistência implica no aumento das taxas de morbidade e custos no tratamento farmacológico (UGHACHUKWU; UNEKWE, 2012). Com isso, é necessário que pesquisas por novos agentes tornem-se constantes. É dentro desse contexto que muitos estudos de atividade antifúngica têm sido realizados com produtos naturais, onde alguns óleos essenciais mostraram atividade antimicrobiana contra uma grande variedade de microorganismos (BECKER et al., 2017). Dentre os produtos naturais, os terpenos são muito estudados, destacando-se nessa classe os monoterpenos, por serem dotados de uma grande diversidade estrutural e potencial antimicrobiano (BAKKALI et al., 2008; ZHANG et al., 2016). Neste estudo, foram utilizados os monoterpenos citronelol e geraniol.

Considerando a crescente importância dada às infecções ocasionadas por dermatófitos nos últimos anos e consequente aumento de cepas fúngica resistentes, as pesquisas envolvidas com a busca de novos produtos antifúngicos tornam-se relevantes. Porém, pouca atenção se tem dado às enormes implicações na utilização de concentrações inapropriadas ou subinibitórias das drogas. Pois muitos fungos são capazes de desenvolver mecanismos

adaptativos a estresses externos, sobrevivendo a exposições normalmente letais desses mesmos estresses (MORAN et al., 2007).

Portanto, foi investigado o efeito da pressão antifúngica de concentrações subinibitórias de citrionelol e geraniol sobre o perfil de resistência das cepas de *T. rubrum*, *M. canis* e *M. gypseum* frente a fármacos azólicos como cetoconazol, fluconazol e itraconazol. Embora possuam reconhecida atividade antimicrobiana, não há relatos de estudos que investiguem a capacidade adaptativa de dermatófitos frente à citrionelol e geraniol, nem tampouco se este fenômeno adaptativo é reversível.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a capacidade de desenvolvimento de resistência por isolados clínicos de *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* e *Microsporum gypseum* aos monoterpenos geraniol e citronelol.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima de geraniol, citronelol e dos fármacos azólicos cetoconazol, fluconazol e tiraconazol;
- avaliar o desenvolvimento de resistência dos fungos quando cultivados em concentrações subinibitórias dos monoterpenos;
- verificar o desenvolvimento de resistência cruzada aos compostos azólicos e
- verificar a influência de subseqüentes ciclos de desabituação aos monoterpenos sobre a reversibilidade da resistência fúngica direta e cruzada aos antifúngicos.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Dermatófitos e dermatofitoses

As dermatofitoses são infecções fúngicas em tecidos queratinizados como unhas, cabelos e estrato córneo da pele, são causadas principalmente por fungos denominados dermatófitos, compreendendo os gêneros *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*. Estão entre as infecções fúngicas mais comuns em todo o mundo, atingindo vários grupos etários e afetando negativamente a qualidade de vida de pacientes infectados (AZULAY et al., 2008; PERES et al., 2010). A transmissão pode ocorrer por contato direto com seres humanos ou animais infectados ou indiretamente, por contato com fômites contaminados (DEGREEF, 2008).

A patogênese das dermatofitoses é dependente de fatores fúngicos e do hospedeiro, que permitem o estabelecimento do fungo no tecido do indivíduo. Isso ocorre concomitantemente com a ativação do sistema imune do hospedeiro, que visa eliminar o patógeno. Vários fatores de virulência fúngica são responsáveis pelo estabelecimento da infecção, e contribuem para danos nos tecidos, incluindo a degradação e uso de tecido do hospedeiro como fonte de nutrientes. No entanto, a resposta inflamatória ativada pela presença do fungo ou liberação de seus metabólitos e fatores de virulência também desempenha um papel significativo no dano tecidual durante a infecção (ROMANI et al., 2011; HUBE et al., 2015).

Os fungos causam doenças que vão desde infecções cutâneas superficiais até casos profundos e disseminados que atingem os pulmões, fígado, baço, rins e sistema nervoso. Embora as infecções cutâneas ou a dermatomicose sejam raramente ameaçadoras da vida, são as infecções fúngicas mais prevalentes em todo o mundo, algumas vezes levando a uma qualidade de vida reduzida em pacientes (NENOFF et al., 2014). Determinados sinais clínicos predominam dependendo do local afetado. As infecções fúngicas podem ser classificadas de acordo com as localizações anatômicas das lesões, utilizando a denominação *tinea* seguida do sítio anatômico onde se localiza a infecção, escrita em latim. Estas manifestações incluem: lesões do couro cabeludo, *tinea capitis* (Fig.1), lesões disseminadas, *tinea corporis* (Fig. 2), lesões nos espaços interdigitais e nas regiões plantares do pé, *tinea pedis* (pé de atleta) e lesões ungueais, *tinea unguium* (Fig. 3) (DEGREEF, 2008).

Figura 1: *Tinea capitis.*



Fonte: PIRES et al., 2013.

Figura 2: *Tinea corporis.*



Fonte: PIRES et al., 2013.

Figura 3: *Tinea unguium*.



Fonte: PIRES et al., 2013.

As dermatofitoses afetam os pacientes do sexo masculino e feminino de todas as idades e têm uma distribuição mundial. No entanto, climas quentes e úmidos, como em áreas tropicais e subtropicais, contribuem para a alta prevalência do número de casos em países da América Latina, África e Ásia (BHAGRA et al., 2014; FAURE-COGNET et al., 2016). Comprometem aproximadamente 40% da população mundial, e as infecções ungueais representam 18% - 40% das onicopatias (ARAÚJO et al., 2003), representando um problema de saúde pública. Sua prevalência é altamente variável, pois depende de parâmetros climáticos como a umidade e a temperatura e de características de cada paciente, como idade, sexo, predisposição a doenças, localização anatômica da lesão, status socioeconômico e ocupação (FAERGEMANN et al., 2003).

As dermatofitoses estão entre as formas mais frequentes de infecções humanas. Em vários países da Europa (Reino Unido, Suécia, Alemanha, Bélgica, Polônia, Eslováquia, Espanha e Grécia), Oriente Médio (Turquia e Irã), América Central e do Norte (Estados Unidos e México), o *T. rubrum*, foi responsável pelo elevado número de infecções, tendo destaque para *tinea pedis* e onicomicose (LÓPEZ-MARTÍNEZ et al., 2010; DRAKENSJÖ et

al., 2011; MARAKI et al., 2012; BUDAK et al., 2013; REZAEI-MATEHKOLAEI et al., 2013; NENOFF et al., 2014). No Japão, Líbano e Arábia Saudita, *T. mentagrophytes* foi o dermatófito que teve maior prevalência, ocasionando principalmente *tinea corporis* (ARAJ et al., 2004; SEI, 2012). Itália, Índia, Haiti e alguns países do continente africano (Nigéria, Senegal, Etiópia) foram detectados um número maior de casos de *tinea capitis*, onde os principais agentes etiológicos foram *T. verrucosum*, *T. tonsuras*, *T. rubrum*, *T. soudanense*, *T. violaceum*, *M. canis* e *M. audouinii* (BALAKUMAR et al., 2012; HANUMANTHAPPA et al., 2012; NASERI et al., 2013; COULIBALY et al., 2015; NDIAYE et al., 2015; THAKUR, 2015).

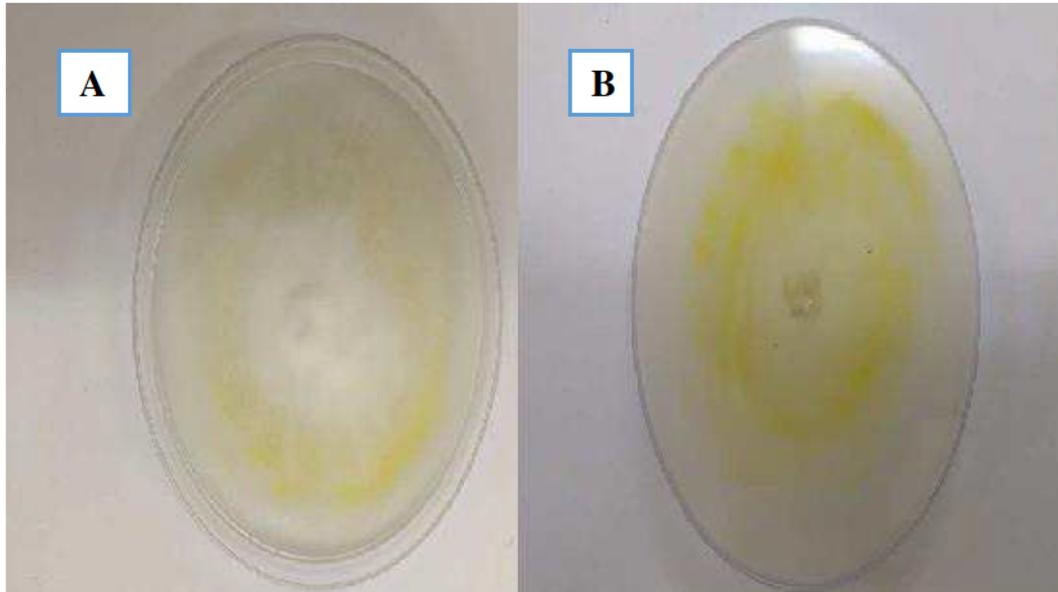
No Brasil, numa região metropolitana de Porto Alegre, *T. rubrum*, seguido por *T. interdigitali* foram às espécies mais comuns encontradas (HEIDRICH et al., 2015). No Nordeste do Brasil, de abril de 2013 a dezembro de 2014, na cidade de Natal, Estado do Rio Grande do Norte, foram identificados dez gêneros de fungos clinicamente importantes causadores de infecções superficiais, tendo destaque os gêneros *Trichophyton* e *Microsporum*. Nesse estudo, foi observada uma maior prevalência das espécies de *T. rubrum* em infecções na pele glabra e na região inguinocrural, enquanto que *T. tonsurans* e *M. canis* foram especificamente encontrados no couro cabeludo (SILVA-ROCHA et al., 2016). No Brasil, *T. rubrum* continua sendo o dermatófito mais frequentemente isolado em diversos sítios anatômicos (DAMÁZIO et al., 2007).

O *T. rubrum* continua sendo o dermatófito mais comum no mundo. O termo *Trichophyton* é derivado das palavras gregas "θρίχός" "cabelo" e "φυτόν" "planta"; "rubrum" (latim para vermelho) refere-se à pigmentação avermelhada encontrada na cultura fúngica na parte inferior da colônia. Suas estruturas alvo são o estrato córneo da epiderme e a queratina ungueal. É o principal agente etiológico da *tinea unguium* (MÜGGE et al., 2006). Dentre os fungos isolados de infecções cutâneas, o dermatófito antropofílico *T. rubrum* é o mais frequente em casos clínicos de *tinea pedis* (pés), *tinea unguium* (unhas), *tinea corporis* (corpo) e *tinea cruris* (virilhas). (SEEBACHER et al., 2008). Além das lesões cutâneas, também é descrito a ocorrência de processos infecciosos mais profundos envolvendo *T. rubrum*. Geralmente, indivíduos com AIDS, ou que fazem uso prolongado de corticosteroides, de quimioterapia e drogas imunossupressoras e em transplantados há uma maior prevalência dessas infecções (Wu et al., 2013).

O gênero *Microsporum* compreende uma gama de variedades de espécies envolvidas em infecções em humanos e animais. As espécies mais frequentemente isoladas são *M. canis* e *M. gypseum*. Epidemiologicamente, alguns estudos colocam esses fungos em destaque dentre os principais agentes etiológicos de dermatofitoses. Em países pobres ou em desenvolvimento das regiões África, Ásia e América, as dermatofitoses são consideradas endêmicas, variando apenas nos principais agentes etiológicos entre os quais se destacam os gêneros *Trichophyton* e *Microsporum*. Na Europa Central e Sudeste e Estados Unidos, *M. canis* é colocado como principal causador de *tinea capitis*, principalmente em crianças (SEEBACHER et al., 2008; AMEEN, 2010).

O *M. canis* é um dermatófito zoofílico, pois têm como hospedeiro preferencial espécies animais em especial os felinos, mas também suínos, aves, caninos e bovinos. A partir destes, o homem pode ser infectado. De acordo com um estudo, na Itália central, realizado com 100 animais, 13% dos gatos que vivem em agregados familiares são portadores de *M. canis*, o patógeno foi identificado em 100% dos gatos ociosos (IORIO et al., 2007). Ao infectar animais de estimação como cães e gatos, partículas infectadas perdem-se no meio domiciliar de modo que o contato com essas estruturas pode resultar em infecções familiares. Os dermatófitos (Fig. 4) pertencentes ao grupo dos fungos geofílicos apresentam-se como saprófitas nos solos e tem a habilidade de colonizar tecidos queratinizados como penas, pêlos, escamas, cabelos, cascos, chifres, que estejam em processo de decomposição, após terem sido dissociados dos seres vivos. A infecção pode ocorrer quando há o contato de áreas expostas diretamente com o material infectado. O principal dermatófito geofílico e virulento é o *M. gypseum*, relatado como agente causador de dermatofitoses em humanos e animais (SIMPANYA, 2000).

Figura 4: Cepa caracterizando as espécies de fungos dermatófitos.



Legenda: A) Micélio aéreo; B) Micélio vegetativo.

Fonte: Dados do autor.

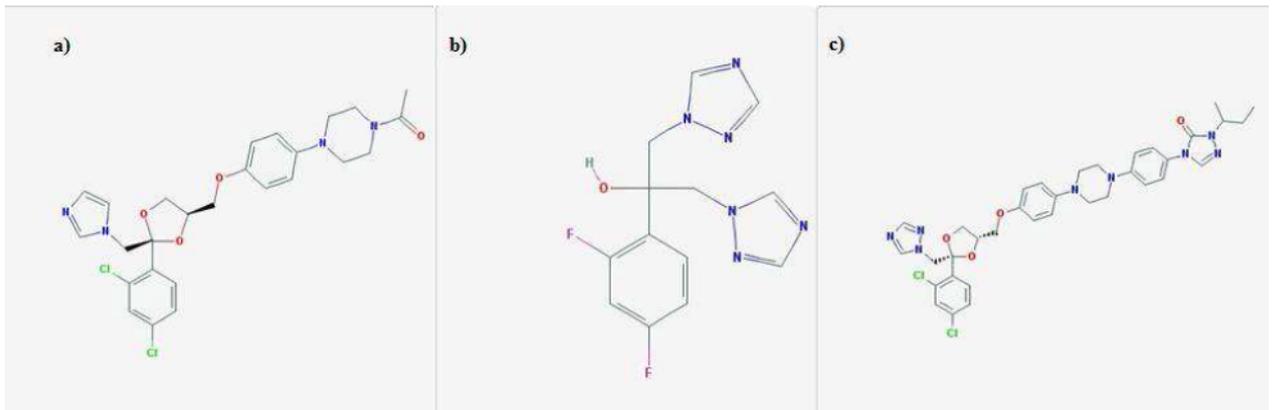
3.2 Tratamento farmacológico e resistência

O desenvolvimento de agentes antifúngicos ficou atrás do de drogas antibacterianas, devido, em parte, à incidência relativamente baixa de doenças fúngicas graves. Além disso, os fungos são eucarióticos, semelhantes às células humanas, e encontrar agentes com toxicidade seletiva que visam o fungo e não o hospedeiro é difícil (MAHMOUD, 2016).

As dermatofitoses podem ser tratadas com fármacos de uso tópico, sistêmico ou associando-se ambas as formas de tratamento a depender do perfil de sensibilidade do fungo, do sítio acometido, da extensão da lesão, entre outros fatores. A associação das duas formas é usada geralmente para os casos ainda mais complicados, crônicos ou para os portadores de *tinea unguium* e *tinea capitis* (VAN MINNEBRUGGEN et al., 2010). Alguns agentes se destacam na utilização clínica para o tratamento das dermatofitoses, entre os quais existem os fármacos imidazólicos como cetoconazol e os compostos triazólicos, a exemplo do itraconazol e fluconazol (Fig. 5), ambos derivados sintéticos (FERNÁNDEZ-TORRES et al., 2003).

Os fármacos azólicos atuam inibindo a biossíntese do ergosterol, o principal esterol presente na membrana celular fúngica. Esta interferência se processa por meio da inibição da 14- α -demetilase, enzima que catalisa a remoção oxidativa do grupo 14- α -metil do lanosterol, um dos intermediários da biossíntese de ergosterol. Com a depleção do ergosterol e sua substituição com esteróis incomuns como o lanosterol, ocorre desagregação no arranjo dos lipídios de membrana, alterando a fluidez da membrana. Dessa forma, há consequências secundárias nas funções de determinadas enzimas ligadas à membrana na síntese da parede celular e na ATPase, inibindo, assim, o crescimento fúngico (ODDS et al., 2003; VANDEPUTTE et al., 2012).

Figura 5: Estrutura química dos compostos azólicos.



Legenda: a) CETOCONAZOL (1-[4-[4-[[[(2R, 4S)-2-(2,4-dichlorofenil)-2-(imidazol-1-ilmetil)-1,3-dioxolan-4-il]metoxi]fenil]piperazin-1-il]etanone; b) FLUCONAZOL (2-(2,4-difluorofenil)-1,3-bis (1,2,4-triazol-1-il)propan-2-ol); c) ITRACONAZOL (2-butan-2-il-4-[4-[4-[[[(2R,4S)-2-(2,4-diclorofenil)-2-(1,2,4-triazol-1-ilmetil)-1,3-dioxolan-4-il]metoxi]fenil]piperazin-1 il]fenil]-1,2,4-triazol-3-one.

Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, acessado em 20/03/2017.

Devido a fracos perfis de penetração cutânea, os antifúngicos tópicos não são ideais para infecções superficiais de pelos e unhas, como *tinea capitis*, *tinea barbae*, *tinea unguium* e onicomicose. Nestes casos, o tratamento oral e não tópico, administrando azóis e alilaminas (terbinafina) é recomendado. Além disso, griseofulvina oral pode ser usado como uma terapia alternativa (VAN MINNEBRUGGEN et al., 2010). Com isso, a utilização de fármacos mais antigos no mercado vem sendo uma escolha. A griseofulvina é um agente antifúngico derivado do *Penicillium griseofulvum*, que em 1958 foi o primeiro agente antifúngico oral a se tornar disponível para uso clínico, utilizado para o tratamento de micoses superficiais. Atua

através da inibição da síntese da parede das células fúngicas, a ligação ao RNA, à interferência com a síntese de ácidos nucleicos e a inibição dos microtúbulos, essenciais para a mitose e os processos de transporte citoplasmático (VAN MINNEBRUGGEN et al., 2010).

Outra droga vastamente utilizada é a terbinafina, derivado sintético das alilaminas, que foi introduzido pela primeira vez nos Estados Unidos, como tratamento para onicomicose na década de 1990. Posteriormente ganhou popularidade como um tratamento off-label para *tinea capitis* (GUPTA et al., 2013). Além disso, é bastante utilizada em associação com o itraconazol, preferida devido à sua capacidade de penetrar no leito ungueal e na placa ungueal e manter níveis terapêuticos elevados, e com grande eficácia (ROSSO, 2014). A terbinafina exerce o seu efeito através da inibição da esqualeno epoxidase, bloqueando assim a biossíntese do ergosterol, um componente importante das membranas celulares fúngicas. Como resultado, este agente interrompe a síntese da membrana das células fúngicas inibindo assim o crescimento dos fungos (GHELARDI et al., 2014).

Embora pareça que o número de fármacos antifúngicos disponíveis no mercado seja grande, eles estão agrupados em poucas classes químicas e, muitas vezes, com espectro de ação restrito. Além disso, o sucesso no tratamento com antifúngicos pode ser prejudicado porque as dermatofitoses ocasionadas por *T. rubrum*, geralmente são associadas com elevada recidiva e resistência às drogas. Assim como outros micro-organismos, as células fúngicas possuem uma grande habilidade de desenvolver resistência a compostos tóxicos (PERES et al., 2010; MICELI et al., 2011).

Essa resistência se dá pelo fato dos micro-organismos terem a capacidade de desenvolver mecanismos para contrariar os efeitos fungicidas ou fungistáticos das classes de antifúngicos, que são baseados em três mecanismos principais, (I) a redução da acumulação do fármaco no interior da célula fúngica, (II) diminuição da afinidade da droga pelo o seu alvo e (III) alterações do metabolismo para contrabalançar o efeito de drogas. Muitas vezes, a associação de vários mecanismos está envolvida nessa resposta do micro-organismo às drogas (VANDEPUTTE et al., 2012). Os diversos mecanismos variam de acordo com a cepa, a droga ou condições ambientais (DEISING et al., 2008; PERES et al., 2010).

3.3 Terpenos

Apesar da descoberta de novas moléculas e da disponibilidade de novas formulações para reduzir a toxicidade e aumentar a biodisponibilidade, a procura de novos agentes antifúngicos e a caracterização de novos alvos são uma necessidade contínua (AGARWAL et al., 2008; MARTINEZ-ROSSI et al., 2008; WIEDERHOLD; PATTERSON, 2015). Com isso, o uso de produtos naturais surge como uma grande alternativa terapêutica, e certamente é uma das estratégias mais bem sucedidas na descoberta de novas moléculas candidatas a futuros fármacos, envolvendo a participação das ciências biológicas, farmacêuticas, médicas e a química (NEWMAN; CRAGG, 2007).

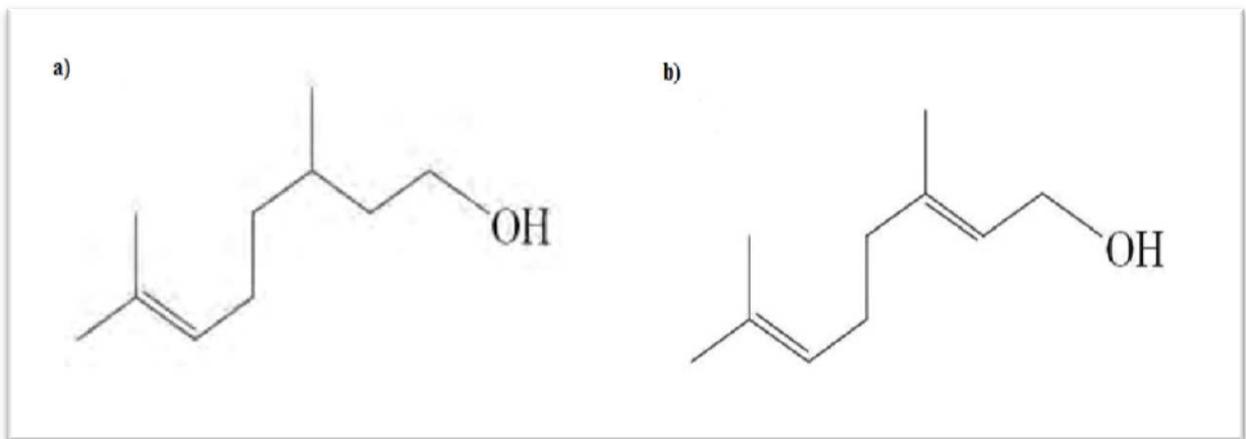
Os óleos essenciais são complexos de compostos voláteis encontrados em suas folhas, resinas, frutos, flores, troncos e outras partes das plantas. Seus componentes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e até mesmo compostos com enxofre. Entre esses, os terpenos merecem destaque, pois são importantes constituintes de óleos essenciais de diversas plantas aromáticas e possuem marcada propriedade antimicrobiana. Os terpenos são compostos hidrogenados de cadeias carbônicas cíclicas ou alifáticas, largamente distribuídos na natureza. Os terpenos são classificados de acordo com suas unidades de átomos de carbono em hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}) (SIMÕES; SPITZER, 2007; BAKKALI et al., 2008).

Os componentes geraniol e citronelol (Fig. 6) são constituintes voláteis classificados como monoterpenos, pois são formados pela união de duas unidades de isopreno. Embora apresentem estruturas químicas semelhantes, são observadas sutis diferenças que podem interferir com o potencial farmacológico de cada droga. Podem ser encontrados em óleos essenciais de plantas medicinais aromáticas como *Cymbopogon winterianus* (Poaceae) (OLIVEIRA et al., 2011) e outras plantas aromáticas (FREIRE et al., 2012, KIM; PARK, 2012).

O geraniol é um monoterpeno com um grupo alcoólico e duas ligações duplas. Os pesquisadores mostraram que geraniol tem uma proeminente ação repelente (SEMMLER et al., 2014), inseticida (JEON et al., 2009), antimicrobiana (PEREIRA et al., 2014) e atividades antitumorais (WISEMAN et al., 2007). O citronelol difere de geraniol por apresentar apenas

uma dupla ligação em sua estrutura. O citronelol demonstrou ação repelente (SEMMLER et al., 2014), larvicida (HIERRO et al., 2004), antinociceptiva, antimicrobiana (PEREIRA et al., 2014) e ação anti-inflamatória (BRITO et al., 2012). Atualmente, encontram-se na literatura relatos confirmando o potencial antifúngico de geraniol frente a cepas de *Aspergillus* spp, *Fusarium oxysporum* e *Penicillium digitatum* (AOUDOU et al., KIM; PARK, 2012).

Figura 6: Estrutura química dos monoterpenos citronelol e geraniol.



Legenda: a) CITRONELOL (3,7-dimetiloct-6-em-1-ol); b) GERANIOL (2E-3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-ol).

Fonte: Dados do autor.

4 METODOLOGIA

4.1 Local de trabalho

O trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia, ambos da Unidade Acadêmica de Saúde (UAS) do Centro de Educação e Saúde (CES), da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

4.2 Drogas-teste

As drogas-teste citronelol, geraniol, cetoconazol, fluconazol e itraconazol foram adquiridas da Sigma-Aldrich® (Brasil). As soluções foram preparadas no momento de execução dos testes, dissolvendo-as primeiramente em 100 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) a 100% e utilizando água destilada esterilizada em quantidade suficiente para obter a concentração inicial de 1024 µg/mL. A partir dessa concentração, foram feitas diluições seriadas em razão de dois até alcançar a concentração de 1 µg/mL utilizando o meio RPMI 1640.

4.3 Cepas fúngicas

Para os ensaios de atividade antifúngica, foram selecionadas cepas de *T. rubrum* LM 305 (isolada de lesões de pele), *M. canis* LM 216 (isolada de lesões de couro cabeludo) e *M. gypseum* LM 305 (isolada de lesões de pele) obtidas da coleção do Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal da Paraíba. Todas as cepas foram mantidas em tubos de ensaio contendo ágar batata dextrose inclinado sob refrigeração (8°C), no Laboratório de bioquímica do CES-UFCG.

4.4 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados foram os meios sólidos ágar Sabouraud dextrose (ASD) e ágar batata dextrose (ABD), os quais foram solubilizados com água destilada e esterilizados em autoclave, a 121°C por 15 minutos, conforme normas do fabricante (Difco®). O meio

líquido RPMI 1640 com glutamina e sem bicarbonato também foi utilizado e preparado de acordo com o documento M38-A do CLSI (2002).

4.5 Inóculo

Para induzir a formação de conídios, as cepas fúngicas foram cultivadas em ABD a 28°C por 7 dias. As colônias fúngicas recentes foram cobertas com solução salina estéril (NaCl 0,9 %), e as suspensões feitas por suaves agitações com auxílio de uma alça descartável esterilizada. A mistura resultante de conídios e fragmentos de hifas foi transferida para tubos de ensaio esterilizados. Após agitação de 15 segundos, cada suspensão foi deixada em repouso por 3-5 minutos e o sobrenadante foi recolhido em tubos de ensaio estéreis. A densidade das suspensões de cada cepa foi ajustada em espectrofotômetro a 520 nm para um valor de 70-72% de transmitância, a qual corresponde a um inóculo de aproximadamente $0,5 - 5 \times 10^6$ unidades formadoras de colônias em 1 mL (UFC/mL) (CLSI, 2002; SANTOS et al., 2006; BARROS et al., 2006).

4.6 Determinação da concentração inibitória mínima

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das drogas-teste foi realizada pela técnica de microdiluição, utilizando placas de microtitulação contendo 96 cavidades com fundo chato (CLSI, 2002; SANTOS; HAMDAN, 2005). Em cada linha da placa, foram adicionados 100 µL das drogas-teste duplamente concentradas e diluídas em RPMI 1640. Em cada cavidade da placa, foram adicionados 100 µL do inóculo previamente preparado, diluído em RPMI 1640 na proporção 1:50. Um controle fúngico foi realizado substituindo as drogas-teste por solução salina esterilizada (controle de crescimento). Um controle de esterilidade também foi realizado, colocando-se apenas o meio de cultura, sem o inóculo. Para verificar a ausência de interferência nos resultados pelo DMSO utilizado na preparação das soluções, foi feito um controle com DMSO na concentração usada para a solubilização das drogas acrescido do inóculo e do meio de cultura. As placas foram seladas e incubadas a 28°C por até 7 dias para a realização da leitura. Os valores de CIM foram determinados pela análise visual da inibição do crescimento em cada cavidade, comparando-

se os testes com o controle de crescimento (ausência de drogas). O experimento foi realizado em triplicata e os valores de CIM foram expressos como média geométrica.

4.7 Indução de resistência antifúngica

Tubos de ensaios contendo ASD livre de drogas (controle) e também acrescidos de citronelol ou geraniol, na concentração 1/2CIM (subinibitória) ou CIM (inibitória), foram inoculados com um fragmento micelial de 4cm² colônia de cada cepa recém-cultivada em ABD. Estes tubos foram incubados a 28°C, por 5 dias. Após o período de incubação, cada cepa foi subcultivada em outros tubos nas condições anteriormente citadas. Este procedimento foi repetido 8 vezes. As últimas culturas foram usadas para a preparação dos respectivos inóculos com solução salina e sua turbidez ajustada conforme item 4.5. Nesse ponto, foram obtidas as suspensões das novas cepas supostamente resistentes aos monoterpenos. Posteriormente, foi analisado o novo perfil de sensibilidade dessas cepas adaptadas, executando os ensaios de determinação da CIM de geraniol e citronelol frente a essas cepas, conforme item 4.6. (HRYNCEWICZ-GWOŹDZ et al., 2013). O desenvolvimento de resistência foi observado quando houve um aumento no valor da CIM de ao menos uma diluição (cepas não adaptadas) (GHANNOUM et al., 2013). Os ensaios foram realizados em triplicata e os valores de CIM expressos como média geométrica dos resultados.

4.8 Avaliação da resistência cruzada

Considerando o desenvolvimento de resistência pelas cepas de dermatófitos, foi investigado o perfil de sensibilidade destas cepas tratadas com concentrações subinibitórias dos monoterpenos frente aos fármacos azólicos cetoconazol, fluconazol e itraconazol, executando os ensaios de determinação da CIM dos mesmos frente a essas cepas, conforme as condições explicitadas no item 4.6 (CLSI, 2002; SANTOS; HAMDAN, 2005). Um controle de micro-organismo foi realizado paralelamente, onde não foram adicionados os fármacos azólicos no RPMI-1640. Dessa forma, pode-se comparar o novo perfil de sensibilidade dos fungos e confirmar se houve ou não uma resistência cruzada das cepas de dermatófitos aos fármacos azólicos, em consequência da adaptação das mesmas aos monoterpenos.

4.9 Avaliação da estabilidade da resistência

Para avaliar a estabilidade ou reversibilidade da resistência fúngica direta e cruzada aos antifúngicos, um fragmento micelial de 4cm² das cepas resistentes foi colocado na superfície de ASD em tubos de ensaio livre de drogas. Os tubos foram incubados a 28°C por 5 dias. Este procedimento foi repetido 8 vezes. Após isso, as últimas culturas foram usadas para a preparação dos respectivos inóculos com solução salina e sua turbidez ajustada conforme item 4.5. Por fim, foi analisado o novo perfil de sensibilidade dessas cepas adaptadas, executando os ensaios de determinação da CIM das drogas-teste frente a essas cepas, conforme item 4.6. Dessa forma, foi possível comparar o perfil de sensibilidade e confirmar se houve ou não uma reversão do quadro de resistência das cepas de dermatófitos às drogas-teste (GHELARDI et al., 2014).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, determinou-se a CIM dos fármacos cetoconazol, fluconazol e itraconazol e dos monoterpênicos citronelol e geraniol frente a cada uma das cepas (*T. rubrum* LM 305, *M. canis* LM 216 e *M. gypseum* LM 305). Os resultados estão demonstrados na tabela 1. Os dermatófitos foram mais resistentes ao fluconazol, pois o crescimento foi inibido a uma maior concentração do fármaco (2 µg/mL). Para os produtos naturais, citronelol e geraniol foram mais ativos contra *T. rubrum* LM 305 (CIM = 64 µg/mL), para os outros dermatófitos, ambas as drogas apresentaram valores de CIM 256 µg/mL e 128 µg/mL, respectivamente.

Tabela 1– Valores de concentração inibitória mínima (µg/mL) das drogas-teste sobre cepas de dermatófitos.

Drogas	<i>T. rubrum</i>	<i>M. canis</i>	<i>M. gypseum</i>
	LM 305	LM 216	LM 305
Citronelol	64	256	256
Geraniol	64	128	128
Cetoconazol	1	1	1
Fluconazol	2	2	2
Itraconazol	1	1	1

*Média geométrica de três experimentos.

Fonte: Dados do autor.

Citronelol e geraniol foram selecionados para o trabalho por possuírem comprovada ação antifúngica. Estudos anteriores apontam a inibição da biossíntese de ergosterol como possível mecanismo da atividade antifúngica do citronelol e geraniol contra cepas de *T. rubrum* (PEREIRA et al., 2014). Em relação à CIM dos monoterpênicos frente a cepas de *T. rubrum*, segundo achados de Pereira et al. (2014), 64 µg/mL foi capaz de inibir seu crescimento, corroborando com os do presente estudo na cepa *T. rubrum* LM 305, onde ambos estudos utilizaram o método de microdiluição. Um estudo de Cardoso et al. (2015)

mostrou que Geraniol foi ativo contra cepas de *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans*, em CIM baixas 76 µg/mL e 156 µg/mL respectivamente.

Por não encontrar na literatura relatos sobre a resistência de dermatofitos a produtos naturais, incluindo monoterpenos, o presente estudo buscou saber se é possível o desenvolvimento dessa resistência *in vitro*. Ainda, saber se a mesma pode se dar de maneira cruzada com os compostos azólicos, pois ambos possivelmente compartilham o mesmo mecanismo de atividade antifúngica.

Para isso, as cepas fúngicas foram submetidas a um tratamento de subseqüentes cultivos na presença de concentrações subinibitórias de citronelol e geraniol (pressão antifúngica). Estes novos valores obtidos irão servir para comparar com os valores iniciais (antes da pressão antifúngica). Ocorrendo mudanças nos valores de CIM, pode-se inferir que houve desenvolvimento de resistência das cepas aos monoterpenos. Neste ensaio, também foi realizado um experimento controle utilizando ASD isento de drogas. Após isso, não foram observadas mudanças nos valores de CIM, para cada cepa testada, em relação ao estado inicial (dados não mostrados). Os resultados estão expressos na tabela 2.

A cepa de *T. rubrum* LM 305, após pressão antifúngica de citronelol, apresentou aumento nos seus valores de CIM (resistência) de citronelol. Neste caso, houve mudança também nos valores de CIM de fluconazol e geraniol, de forma cruzada. Após tratamento com geraniol, a CIM de geraniol também se alterou passando de 64 µg/mL para 256 µg/mL (resistência). Esta cepa adaptada ao geraniol, não apresentou resistência cruzada aos azólicos, apenas ao citronelol.

A cepa *M. canis* LM 216 desenvolveu resistência a ambos os monoterpenos após processo de pressão antifúngica. Ainda, os valores de CIM de cetoconazol, fluconazol e itraconazol aumentaram (resistência cruzada), tanto após o tratamento com geraniol quanto com citronelol. O tratamento dessa cepa com citronelol induziu resistência cruzada ao geraniol. No entanto, quando tratada com geraniol, esta cepa se tornou mais sensível ao citronelol.

M. gypseum LM 305 também desenvolveu resistência a geraniol e citronelol após pressão antifúngica. Esta cepa mostrou comportamento semelhante à cepa *M. canis* LM 216 no tocante ao aparecimento de resistência cruzada aos azóis. Ainda, o tratamento dessa cepa

com citronelol não induziu resistência cruzada ao geraniol. No entanto, quando tratada com geraniol, esta cepa se tornou mais sensível ao citronelol.

Tabela 2– Sensibilidade de cepas de dermatófitos após indução de resistência antifúngica na presença de citronela e geraniol.

Drogas	CIM após passagens em meio com Citronelol			CIM após passagens em meio com Geraniol		
	<i>T. rubrum</i> LM 305	<i>M. canis</i> LM 216	<i>M. gypseum</i> LM 305	<i>T. rubrum</i> LM 305	<i>M. canis</i> LM 216	<i>M. gypseum</i> LM 305
Citronelol	256	512	512	256	128	128
Geraniol	128	256	128	256	256	256
Cetoconazol	1	2	4	1	2	4
Fluconazol	4	16	16	2	16	16
Itraconazol	1	2	2	1	2	2

*Média geométrica dos experimentos. CIM: µg/mL

Fonte: Dados do autor

A incidência de infecções fúngicas aumentou drasticamente ao longo das últimas três décadas e, simultaneamente, foi acompanhada por um aumento de resistência adquirida e inata a drogas antifúngicas (VANDEPUTTE et al., 2012). Os relatos na literatura de resistência adquirida em fungos dermatófitos são escassos, principalmente com óleos essenciais e seus fitoconstituintes. Osborne et al. (2003) investigaram a resistência adquirida à terbinafina em *T. rubrum* com cepas cultivadas com concentrações subinibitórias da droga. E mais recentemente, um estudo de Hryniewicz-Gwoźdz et al. (2013), investigou a capacidade de desenvolvimento de resistência por *T. rubrum* quando submetido a pressão antifúngica de fluconazol e itraconazol. Nesse estudo, os autores citam que passagens

sequenciais de isolados clínicos de *T. rubrum* na presença de Fluconazol ou Itraconazol resultou num aumento nas CIM de ambos os fármacos para a maioria dos isolados. Isto indica claramente a capacidade de *T. rubrum* para desenvolver resistência adquirida, após exposição a concentrações subinibitórias das drogas.

Atsushi Iwata et al. (2014) avaliaram o efeito da exposição contínua de eficonazol na susceptibilidade a dermatófitos em duas condições experimentais: a primeira foi, *in vitro*, em que os fungos foram subcultivados em série durante 12 passagens na presença de concentrações subinibitórias de eficonazol; e a segunda foi num modelo animal de onicomicose, com tratamento tópico com eficonazol por 8 semanas. Nos resultados do trabalho, os autores descrevem que não foi observada resistência em ambos os testes devido às mudanças nas CIM não serem significativas, segundo critérios considerados pelos autores. No entanto, os seus resultados demonstram claramente que houve mudanças nos valores de CIM, o fato que eles mencionam de não ter ocorrido resistência se dá pelos critérios que eles determinaram para decidir se houve ou não o surgimento de resistência. Nesse trabalho, levamos em consideração que ocorreu resistência quando ao menos o valor de CIM aumentava em uma diluição, que dá uma proporção de cem por cento de aumento na CIM.

Os mecanismos responsáveis pela resistência de *T. rubrum* e outras espécies de dermatófitos a derivados azólicos são muito pouco compreendidas, porém alguns mecanismos bioquímicos foram relatados. Um mecanismo proposto para explicar a resistência de *T. rubrum* a fármacos azólicos é o efluxo de drogas por aumento na expressão de bombas de efluxo. Os genes TruMDR1 e TruMDR2 de *T. rubrum*, que codificam para os transportadores (bombas de efluxo), demonstraram ser superexpressos pelo fungo na presença de várias drogas antifúngicas, incluindo os azólicos (MARTINEZ-ROSSI et al., 2008). Outro mecanismo que pode estar envolvido na resistência a compostos azólicos refere-se ao aumento da regulação do lanosterol-14 α -desmetilase, o alvo molecular para os compostos azólicos. A superexpressão do gene ERG11, que codifica essa enzima, foi evidenciado em *T. rubrum* após exposição a concentrações subinibitórias de cetoconazol (MARTINEZ-ROSSI et al., 2008).

As bombas de efluxo são expressas em todas as células, cuja atividade confere proteção aos efeitos tóxicos de diversos agentes químicos. Geralmente, essas bombas reconhecem uma grande diversidade de substratos baseadas em suas propriedades físicas, por

isso, elas podem mediar a resistência a múltiplas drogas em fungos (UGHACHUKWU; UNEKWE, 2012).

As bombas de efluxo como transportadores do tipo ABC (*ATP-binding cassette*) estão entre as principais bombas de efluxo envolvidas em mecanismos de resistência a múltiplas drogas. Elas são proteínas integrais de membrana (ATPases), altamente conservadas, que utilizam a energia oriunda do ATP (trifosfato de adenosina) para transportar diversos tipos de substratos diferentes pela membrana contra seu gradiente eletroquímico (DEISING et al., 2008; UGHACHUKWU; UNEKWE, 2012). Dois desses transportadores, TruMDR1 e TruMDR2, foram identificados em *T. rubrum*, mostrando-se importantes não só no processo de resistência a diversos antifúngicos, mas também na patogenicidade do fungo (CERVELATTI et al., 2006; FACHIN et al., 2006; MARANHÃO et al., 2009).

Observou-se neste estudo, que a passagem sequencial de isolados clínicos de *T. rubrum*, *M. canis* e *M. gypseum* na presença de citronelol ou geraniol resultou em um aumento nas CIM de citronelol e geraniol e dos fármacos azólicos testados. Este é o primeiro relato de resistência adquirida por dermatófitos a produtos naturais. Esse achado é de suma importância, pois *in vivo* também é possível que se adquira resistência e ocasione falhas na terapêutica.

Segundo Santos et al. (2007), esta observação *in vitro* tem sua reflexão *in vivo* e é suportada pelo aumento dos valores de CIM para os agentes azólicos, incluindo itaconazol e cetoconazol em cepas de *T. rubrum* obtidas de pacientes com onicomicoses após tratamento com cetoconazol ou uma combinação de itraconazol e terbinafina. Com isso, os resultados também apontam para o desenvolvimento de resistência cruzada, tanto com os fármacos azólicos como entre os monoterpênicos. Isso ocorre possivelmente porque ambos proporcionam semelhantes efeitos tóxicos na célula fúngica. Um estudo com *Candida glabrata* demonstra que o rápido desenvolvimento da resistência aos medicamentos após o início da terapia suporta a percepção de que a exposição a fármacos azólicos pode criar células fúngicas com genomas "evolutivos" altamente variáveis e capazes de avançar rapidamente com a resistência a outros tipos de drogas, como equinocandinas (LEWIS et al., 2013).

McMahon et al. (2007) realizaram uma investigação sobre os efeitos de um cultivo em Meio Luria-Bertani (LB), contendo concentrações subinibitórias (0,25 e 1 %) do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* sobre a resistência aos antibióticos nas cepas bacterianas de *E. coli*, *S. aureus* e *Salmonella* spp. Nesse estudo, foram observados aumentos de duas e de

quatro vezes nos valores de CIM originais de gentamicina, vancomicina, cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina, estreptomicina, trimetoprim, ampicilina, ácido fusídico e mupirocina. Pippi et al. (2015) trazem o contrário do nosso estudo, onde mostram que uma fração rica em benzofenonas obtida da *Dalbergia ecastophyllum* (própolis vermelha brasileira) manteve os valores de CIM para os isolados de algumas espécies de *Candida* com resistência induzida por fluconazol, demonstrando que os mecanismos de resistência de fluconazol desenvolvidos por estas cepas provavelmente não interferem na susceptibilidade ao própolis.

Nas cepas *M. canis* LM 216 e *M. gypseum* LM 305, quando tratadas com geraniol, ocorreu uma diminuição na CIM de citronelol, ou seja, tornando-se mais sensíveis a esse monoterpenos. Essa diminuição pode ter ocorrido devido a um possível efeito cumulativo, pois com pequenas concentrações de uma determinada droga a que um micro-organismo seja submetido a contato constante, a mesma poderá se acumular formando depósitos de alta concentração da substância e causar danos celulares.

Após as cepas testadas terem adquirido resistência, é necessário verificar a influência de subsequentes ciclos de desabituação à ação dos monoterpenos sobre a reversibilidade da resistência fúngica direta e cruzada aos antifúngicos. Sendo assim, avaliamos sua estabilidade segundo descrita no item 4.9. Os resultados foram expressos na tabela 3. Pode-se constatar que a resistência desenvolvida a citronelol pelas cepas não foi permanente e, conseqüentemente, a sensibilidade das cepas aos terpenos foi revertida. Isto é confirmado pela mudança dos valores de CIM para a situação inicial (Tabela 1). Tendo exceção apenas a CIM de geraniol para *T. rubrum* LM 305 resistente a citronelol, onde se constatou estabilidade desta resistência cruzada. De modo semelhante ocorreu com as CIM dos produtos naturais com as cepas que foram resistentes a geraniol, onde a maioria também reverteu sua CIM. Somente em *T. rubrum* que foi observada a estabilização da resistência cruzada a citronelol. Contudo, quando revistas as CIM dos fármacos azólicos tanto quando tratados com citronelol como com geraniol, percebeu-se que não foi possível à reversão da resistência, exceto a CIM de cetoconazol em *M. canis* LM 216 resistente a geraniol.

Borst et al. (2005) cultivaram isolados de *C. glabrata* com resistência adquirida ao fluconazol em meio livre de drogas em 122 dias foi observado fenótipo de perda de resistência quando alterado a subcultura do líquido para meio sólido. Esta questão é

importante para se correlacionar com os nossos resultados, uma vez que a subcultura foi realizada diretamente em meio sólido e a perda de fenótipo também foi observada.

Pippi et al. (2015) trazem que em relação à estabilidade da resistência desenvolvida por isolados de *C. parapsilosis* resistente preservou-se o fenótipo de resistência após subcultura em meio livre de FLZ. Com isso, pode-se inferir em relação aos produtos naturais que a alteração bioquímica nas células fúngicas se deu somente quando na presença do agente estressante, citronelol ou geraniol. Atentando para isso, podemos destacar esse fato como uma vantagem para os produtos naturais, considerando que a resistência aos azólicos desempenha um papel importante nas falhas terapêuticas e consequentemente contribui para a persistência e cronicidade das infecções.

Tabela 3–Reversão da resistência fúngica das cepas Dermatofíticas em meios de cultura isentos de drogas.

Drogas	CIM após passagens em meio isento de Cítronelol			CIM após passagens em meio isento de Geraniol		
	<i>T. rubrum</i> LM 305	<i>M. canis</i> LM 216	<i>M. gypseum</i> LM 305	<i>T. rubrum</i> LM 305	<i>M. canis</i> LM 216	<i>M. gypseum</i> LM 305
Cítronelol	64	64	128	128	64	128
Geraniol	128	64	128	64	64	128
Cetoconazol	4	2	4	8	1	16
Fluconazol	8	32	16	4	32	8
Itraconazol	2	16	4	16	16	2

*Média geométrica dos experimentos. CIM: µg/mL

Fonte: Dados do autor

Várias teorias tentam explicar como as mudanças genéticas que causam resistência aos medicamentos surgem e se estabelecem em populações de fungos. Alguns mecanismos bioquímicos podem estar envolvidos na aquisição de resistência pelos fungos dermatófitos, tanto para explicar as mutações irreversíveis como as reversíveis. A teoria clássica da seleção natural postula que mutações raras e aleatórias surgem em uma população (por exemplo, devido a erros espontâneos ocasionais nos processos de replicação e reparo de DNA) e que uma alteração nas condições de crescimento, como a presença de drogas antifúngicas, favoreceria o surgimento de células resistentes, ou seja, mais adequadas às novas condições. No entanto, parece claro que, em populações bem adaptadas aos seus ambientes estáveis, a diversidade genética é muito menos valiosa do que em populações mal adaptadas ou em momentos de mudança ambiental. Desse ponto de vista, uma estratégia evolutiva vencedora para um organismo seria desenvolver a capacidade de aumentar sua diversidade genética especificamente durante os tempos de estresse (HADANY et al., 2003, RAM et al., 2014).

Em outras palavras, um organismo com a capacidade de modular suas taxas de mutação espontânea e de recombinação, mantendo-as baixas durante condições de baixo estresse e aumentando-as em condições de alto estresse, teria vantagem seletiva sobre organismos com constantes (constitutivamente baixas ou altas) taxas de mutação e recombinação (SHOR; PERLIN, 2015).

Alguns estudos demonstram que as respostas ao estresse celular são geralmente consideradas em termos de seu papel em ajudar as células a tolerar e sobreviver ao estresse agudo. Foi observado que isolados clínicos de *C. albicans* resistentes aos compostos azólicos que alteram a expressão do gene transportador ABC, CDR1 e CDR2, são menos suscetíveis ao derivado de morfolina (FACHIN et al., 2006). Segundo Emilia e colaboradores (2014) os mutantes resistentes a ITZ exibiram valores de CIM aumentados de terbinafina e morfolina sugerindo que os transportadores ABC desempenham um papel na resistência cruzada a esses antifúngicos em *T. rubrum*. No entanto, a observação de que 28% dos mutantes resistentes à ITZ apresentam susceptibilidade restaurada após três passagens em meio não seletivo sugerem que outros mecanismos podem estar envolvidos no desenvolvimento da resistência ao ITZ em *T. rubrum*. No mesmo estudo, os autores trazem que a susceptibilidade restaurada a terbinafina foi observada em 45% dos mutantes resistentes a terbinafina quando a pressão do medicamento foi removida.

6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados no estudo, foi possível concluir que os dermatófitos submetidos a sucessivas passagens em concentrações subinibitórias de citronelol e geraniol, podem desenvolver resistência a essas substâncias. Ainda, essa resistência também pode levar ao aparecimento de cepas resistentes a outras drogas como cetoconazol, fluconazol e itraconazol, de forma cruzada.

Esses resultados são inéditos e colocam os produtos naturais, incluindo os monoterpenos, como agentes terapêuticos susceptíveis a mecanismos de resistência desenvolvidos por fungos patogênicos.

Percebe-se ainda, que a resistência da maioria dos produtos naturais foi revertida, mostrando resultados satisfatórios, elencando pontos muito importantes na terapêutica antifúngica. Onde foi possível demonstrar que os monoterpenos citronelol e geraniol são capazes de desenvolver resistência aos dermatófitos, e que essa resistência pode posteriormente ser revertida. Isso coloca o citronelol e geraniol com grande potencial a futuros agentes terapêuticos. Embora sejam necessários estudos clínicos controlados para definir a verdadeira eficácia, eles se mostraram ativos contra isolados resistentes após a desabitação, o que não ocorreu com a maioria dos azólicos. Após os testes *in vitro* deve se proceder para ensaios *in vivo* com modelo animal, a fim de obter informações preliminares sobre atividade farmacológica e segurança, se tudo estiver nos parâmetros adequados o estudo segue para próxima fase, sendo essa feita em humanos, que são os estudos de fase I, II e III, que possibilitaria avaliar qual a maior dose tolerável, menor dose efetiva, relação dose/efeito, duração do efeito e efeitos colaterais.

7 REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.K.; XU, T.; JACOB, M.R.; FENG, Q.; LI, X.C.; WALKER, L.A.; CLARK, A.M. Genomic and genetic approaches for the identification of antifungal drug targets. *Infect. Disord. Drug Targets*, v.8, n. 1, p. 2–15, 2008.
- AMEEN, M. Epidemiology of superficial fungal infections. *Clinics in Dermatology*, v. 28, n. 2, p. 197–201, 2010.
- AOUDOU, Y.; LÉOPOLD, T. N.; MICHEL, J. D. P.; XAVIER, E. F.; MOSES, M. C. Antifungal properties of essential oils and some constituents to reduce foodborne pathogen. *Journal of Yeast and Fungal Research*, v. 1, n. 1, p. 001-008, 2010.
- ARAJ, G. F.; RACOUBIAN, E. S.; DAHER, N. K. Etiologic agents of dermatophyte infection in Lebanon. *Journal médical libanais*, v. 52, n. 2, p.59–63, 2004.
- ARAÚJO, A. J. G.; SOUZA, M. A. J.; BASTOS, O. M.; OLIVEIRA, J. C. Occurrence of onychomycosis among patients attended in dermatology offices in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 78, n. 3, p.299-308, 2003.
- AZULAY R. D.; AZULAY D. R.; AZULAY-ABULAFIA L. *Dermatologia*. 5. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**; 2008.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils a review. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BALAKUMAR, S.; RAJAN, S.; THIRUNALASUNDARI, T.; JEEVA, S. Epidemiology of dermatophytosis in and around Tiruchirapalli, Tamilnadu, India. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, v. 2, n. 4, p.286–9, 2012.
- BARROS, M. E. S; SANTOS, D. A.; HAMDAN, J. S. *In vitro* methods for antifungal susceptibility testing of *Trichophyton* spp. *Mycological Research*, v. 110, n. 11, p. 1355-1360, 2006.
- BECKER, N. A.; VOLCÃO, L. M.; CAMARGO, T. M.; FREITAG, R. A.; RIBEIRO, G. A. Biological properties of eugenia uniflora L. Essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. *vittale – revista de ciências da saúde*, v. 29, n. 1, 2017.
- BHAGRA, S.; GANJU, A. S.; KANGA, A.; SHARMA, N. L.; GULERIA, R. C. Mycological pattern of dermatophytosis in and around Shimla hills. *Indian Journal of Dermatology*, v. 59, n. 3, p.268-70, 2014.
- BORMAN, A. M.; CAMPBELL, C. K.; FRASER, M.; JOHNSON, E. M. Analysis of the dermatophyte species isolated in the British Isles between 1980 and 2005 and review of worldwide dermatophyte trends over the last three decades. *Medical Mycology*, v. 45, n. 2, p. 131–41, 2007.

- BORST, A., RAIMER, M.T., WARNOCK, D.W., MORRISON, C.J. AND ARTHINGTON-SKAGGS, B.A. Rapid acquisition of stable azole resistance by *Candida glabrata* isolates obtained before the clinical introduction of fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 783–787, 2005.
- BRIAN, P. W. Griseofulvin. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 43, n. 1, p. 1-158, 1960.
- BRITO, R. G.; GUIMARÃES, A. G.; QUINTANS, J. S. S.; et al. Citronellol, a monoterpene alcohol, reduces nociceptive and inflammatory activities in rodents. **Journal of Natural Medicines**, v. 66, n. 4, p. 637–44, 2012.
- BUCHVALD, J.; SIMALJAKOVÁ, M. Epidemiology of dermatomycoses in Slovakia. **Epidemiol Mikrobiol Imunol**, v. 51, n. 2, p. 71–3, 2002.
- BUDAK, A.; BOGUSZ, B.; TOKARCZYK, M.; TROJANOWSKA, D. Dermatophytes isolated from superficial fungal infections in Krakow, Poland, between 1995 and 2010. **Mycose**, v. 56, n. 4, p. 422–8, 2013.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A**. v. 22, n. 16, Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania, United States of America, 2002.
- COULIBALY, O.; THERA, M. A.; PIARROUX, R.; DOUMBO, O. K.; RANQUE, S. High dermatophyte contamination levels in hairdressing salons of a West African suburban community. **Mycoses**, v. 58, n. 2, p. 65–8, 2015.
- DAMÁZIO, P. M. R. B. C.; LACERDA, H. R.; LACERDA FILHO, A. M.; MAGALHÃES, O. M. C.; NEVES, R. P. Epidemiologia, etiologia e formas clínicas das dermatofitoses em Pernambuco, 1995-2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 4, p. 484-486, 2007.
- DEGREEF, H. Clinical Forms of Dermatophytosis (Ringworm Infection). **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 257-65, 2008.
- DRAKENSJÖ, I. T.; CHRYSANTHOU, E. Epidemiology of dermatophyte infections in Stockholm, Sweden: a retrospective study from 2005-2009. **Medical Mycology**, v. 49, n. 5, p. 484–8, 2011.
- FACHIN, A. L.; FERREIRA-NOZAWA, M. S.; MACCHERONI, W. JR.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. Role of the ABC transporter TruMDR2 in terbinafine, 4-nitroquinoline N-oxide and ethidium bromidesusceptibility in *Trichophyton rubrum*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 1093–1099, 2006.
- FAERGEMANN, J.; BARAN, R. Epidemiology, clinical presentation and diagnosis of onychomycosis. **British Journal of Dermatology**, v. 149, n. 65, p. 1 -4 2003.

- FAURE-COGNET, O.; FRICKER-HIDALGO, H.; PELLOUX, H.; LECCIA, M. T. Superficial fungal infections in a French teaching hospital in Grenoble area: retrospective study on 5470 samples from 2001 to 2011. **Mycopathologia**, v. 181, n. 1-2, p. 59-66, 2016.
- FERNÁNDEZ-TORRES, B.; INZA, I.; GUARRO, J. *In vitro* activities of the new antifungal drug erbeconazole and three other topical agents against 200 strains of dermatophytes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5209-5211, 2003.
- FITZPATRICK, T. B. **Tratado de Dermatología**. 7. ed. Rio de Janeiro: Editora Revinter; 2010.
- FOSTER, K. W.; GHANNOUM, M. A.; ELEWSKI, B. E. Epidemiologic surveillance of cutaneous fungal infection in the United States from 1999 to 2002. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 50, n. 5, p. 748-52, 2004.
- FREIRE, M. M.; JHAM, G. N.; DHINGRA, O. D.; et al. Composition, antifungal activity and main fungitoxic components of the essential oil of *Mentha piperita* L. **Journal of Food Safety**, v. 32, n. 1, p. 29-36, 2012.
- GARCÍA-MARTOS, P.; GARCÍA-AGUDO, L.; AGUDO-PÉREZ, E.; GIL DE SOLA F.; LINARES, M. Dermatophytoses due to anthropophilic fungi in Cadiz, Spain, between 1997 and 2008. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 101, n. 3, p. 242-7, 2010.
- GHANNOUM, M., ISHAM, N.; VERMA, A.; PLAUM, S.; FLEISCHER, A. JR.; HARDAS, B. *In vitro* antifungal activity of naftifine hydrochloride against dermatophytes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 57, n. 9, p. 4369-4372, 2013.
- GHELARDI, E.; CELANDRONI, A. F.; GUEYE, S. A.; SALVETTI, A.; SENESI, S.; BULGHERONI, A.; MAILLAND, F. Potential of Ergosterol Synthesis Inhibitors To Cause Resistance or Cross-Resistance in *Trichophyton rubrum*. **American Society for Microbiology**, v. 58, n. 5, p. 2825-2829, 2014.
- GUPTA, A. K.; COOPER, E. A. Update in antifungal therapy of dermatophytosis. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 353-367, 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**, v. 30 n. 1, p. 1-6, 2013.
- HADANY, L.; BEKER, T. On the evolutionary advantage of fitness-associated recombination. **Genetics**, v. 165, n. 4, p. 2167-2179, 2003.
- HANUMANTHAPPA, S. B.; SAROJINI, S. B.; SHILPASHREE, S. B.; MUDDAPUR, S. B. Clinicomycological study of 150 cases of dermatophytosis in a tertiary care hospital in South India. **Indian Journal of Dermatology**, v. 57, n. 4, p. 322-3, 2012.

- HEIDRICH, D.; GARCIA, M. R.; STOPIGLIA, C. D. O.; MAGAGNIN, C. M.; DABOIT, T. C.; VETORATTO, G.; SCHWARTZ, J.; AMARO, T. G.; SCROFERNEKER, M. L. Dermatophytosis: a 16-year retrospective study in a metropolitan area in southern Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 8, p. 865-871, 2015.
- HIERRO, I.; VALERO, A.; PEREZ, P.; et al. Action of different monoterpenic compounds against *Anisakis simplex* s.l. L3 larvae. **Phytomedicine**, v. 11, p. 77–82, 2004.
- HRYNCEWICZ-GWOŹDZ, A.; KALINOWSKA, K.; PLOMER-NIEZGODA, E.; BIELECKI, J. E JAGIELSKI, T. Increase in Resistance to Fluconazole and Itraconazole in *Trichophyton rubrum* Clinical Isolates by Sequential Passages In Vitro under Drug Pressure. **Mycopathologia**. v. 176, n. 1-2, p.49–55, 2013.
- HUBE, B.; HAY, R.; BRASCH, J.; VERALDI, S.; SCHALLER, M. Dermatmycoses and inflammation: the adaptive balance between growth, damage, and survival. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 25, n. 1, p. 44–58, 2015.
- IORIO, R.; CAFARCHIA, C.; CAPELLI, G. et al. Dermatophytoses in cats and humans in central Italy: epidemiological aspects. **Mycoses**, v. 50, n. 6, p. 491–5, 2007.
- JEON, J. H.; LEE, C. H.; LEE, H. S. Food protective effect of geraniol and its congeners against stored food mites. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 7, p. 1468–1471, 2009.
- KIM, E.; PARK, II-K. Fumigant antifungal activity of *Myrtaceae* essential oils and constituents from *Leptospermum petersonii* against three *Aspergillus* species. **Molecules**, v. 17, n. 3, p. 10459–69, 2012.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de micologia médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.
- LEWIS, J. S. N. D.; WIEDERHOLD, N. P.; WICKES, B. L.; PATTERSON, T. F.; JORGENSEN, J. H. Rapid emergence of echinocandin resistance in *Candida glabrata* resulting in clinical and microbiologic failure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 9, p. 4559–4561, 2013.
- LÓPEZ-MARTÍNEZ, R.; MANZANO-GAYOSSO, P.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, F.; BAZÁN-MORA, E.; MÉNDEZ-TOVAR, L. J. Dynamics of dermatophytosis frequency in Mexico: an analysis of 2084 cases. **Medical Mycology**, v. 48, n. 3, p. 476–9, 2010.
- MAHMOUD, G. Azole Resistance in Dermatophytes. **Journal of the American Podiatric Medical Association**, v. 106, n. 1, p. 79-86, 2016.
- MARAKI, S. Epidemiology of dermatophytoses in Crete, Greece between 2004 and 2010. **Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia**, v. 147, n. 3, p. 315–9, 2012.

- MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T. A.; ROSSI, A. antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia**, v.83, n. 5-6, p. 166-369, 2008.
- MICELI, M. H.; DÍAZ, J. A.; LEE, S. A. Emerging opportunistic yeast infections. **Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 142-151, 2011.
- MORAN, P. G.; PINJON, E.; COLEMAN, D. C.; SULLIVAN, D. J. Analysis of drug resistance in pathogenic fungi. **Medical Mycology**, 2007.
- MÜGGE, C.; HAUSTEIN, U. F.; NENOFF, P. Onychomykosen – eine retrospektive Studie zum Erregerspektrum. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 4, p. 218–28, 2006.
- NASERI, A.; FATA, A.; NAJAFZADEH, M. J.; SHOKRI, H. Surveillance of dermatophytosis in northeast of Iran (Mashhad) and review of published studies. **Mycopathologia**, v. 176, n. 3-4, p. 247–53, 2013.
- NDIAYE, M.; DIONGUE, K.; SECK, M. C.; BADIANE, A. S.; DIALLO, M. A.; DEME, A. B. et al. Epidemiological profile of *Tinea capitis* in Dakar (Senegal). A 6-year retrospective study (2008-2013). **Medical Mycology**, v. 25, n. 2, p. 169–76, 2015.
- NENOFF, P.; KRÜGER, C.; GINTER-HANSELMAYER, G.; TIETZ, H. J. Mycology – an update. Part 1: dermatomycoses: causative agents, epidemiology and pathogenesis. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 12, n. 3, p. 188–210, 2014.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-77, 2007.
- NGWOGU, A. C.; OTOKUNEFOR, T. V. Epidemiology of dermatophytoses in a rural community in Eastern Nigeria and review of literature from Africa. **Mycopathologia**, v. 164, n. 4, p. 149–58, 2007.
- NWEZE, E. I.; OKAFOR, J. I. Prevalence of dermatophytic fungal infections in children: are cent study in Anambra state, Nigeria. **Mycopathologia**, v. 160, p. 239 43, 2005.
- ODDS, F. C. Pathogenic fungi in the 21st century. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 200–201, 2000.
- OLIVEIRA, W. A.; PEREIRA, F. O.; LUNA, C. G. D. G.; et al. Antifungal activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor against *Candida albicans*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 433–41, 2011.
- PANASITI, V.; DEVIRGILIIS, V.; BORRONI, R. G.; MANCINI, M.; CURZIO, M.; ROSSI, M.; et al. Epidemiology of dermatophytic infections in Rome, Italy: a retrospective study from 2002 to 2004. **Medical Mycology**, v. 45, n. 1, p. 57-60, 2007.
- PEREIRA, F. O.; MENDES, J. M.; LIMA, I. O.; MOTA, K. S.; OLIVEIRA, W. A.; LIMA, E. O. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols,

against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis.

Pharmaceutical Biology, v. 53, n. 2, p.228-234, 2014.

PERES N. T. A.; MARANHÃO F. C. A.; ROSSI A.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.

Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 5, p. 657-67, 2010.

PIPPI, B.; LANA, A. J.; MORAES, R. C.; GÜEZ, C. M.; MACHADO, M.; DE OLIVEIRA, L. F.; LINO VON POSER, G.; FUENTEFRIA, A. M. *In vitro* evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* spp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 4, p. 839-50, 2015.

PIRES, C. A. A.; CRUZ, N. F. S.; LOBATO, A. M.; SOUSA, P. O.; CARNEIRO, F. R. O.; MENDES, A. M. D. Clinical, epidemiological, and therapeutic profile of dermatophytosis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 88, n. 2, p. 259-64, 2013.

RACCURT, C. P.; DORSAINVIL, D.; BONCY, M.; BONCY, J.; AUGUSTE, G. The emergence of *Trichophyton tonsurans* in Port-au-Prince, Haiti. **Medical Mycology**, v. 47, n. 2, p. 197–200, 2009.

RAM, Y.; HADANY, L. Stress-induced mutagenesis and complex adaptation.

Proceedings Biological sciences Royal Society, v. 7, 2014.

REZAEI-MATEHKOLAEI, A.; MAKIMURA, K.; DE HOOG, S.; SHIDFAR, M. R.; ZAINI, F.; ESHRAGHIAN, M; et al. Molecular epidemiology of dermatophytosis in Tehran, Iran, a clinical and microbial survey. **Medical Mycology**, v. 51, n. 2, p. 203–7, 2013.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n.4, p. 275–88, 2011.

ROSSO, G. Q. D. The Role of Topical Antifungal Therapy for Onychomycosis and the Emergence of Newer Agents. **Clinical and Aesthetic Dermatology**, v. 7, n. 7, p. 10-8, 2014.

SAHIN, I.; OKSUZ, S.; KAYA, D.; SENCAN, I.; CETINKAYA, R. Dermatophytes in the rural area of Duzce, Turkey. **Mycoses**, v. 47, n. 11-12, p. 470–4, 2004.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. Dermatologia. 3. ed. São Paulo: **Artes Médicas**; 2007.

SANTOS, A. D.; DE CARVALHO ARAÚJO, R. A.; SANTOS, A. D.; KOHLER, L. M. Molecular typing and antifungal susceptibility of *Trichophyton rubrum* isolates from patients with onychomycosis pre- and post-treatment. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, n. 5, p. 563–9, 2007.

- SANTOS, D. A.; HAMDAN, J. S. Evaluation of Broth Microdilution Antifungal Susceptibility Testing Conditions for *Trichophyton rubrum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1917-1920, 2005.
- SEEBACHER, C.; BOUCHARA, J. P.; MIGNON, B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 335-352, 2008.
- SEI Y. 2006 Epidemiological survey of dermatomycoses in Japan. **Medical Mycology**, v. 53, n. 3, p. 185-92, 2012.
- SEMMLER, M.; ABDEL-GHAFFAR, F.; SCHMIDT, J.; MEHLHORN, H. Evaluation of biological and chemical insect repellents and their potential adverse effects. **Parasitology Research**, v. 113, n. 1, p. 185-8, 2014.
- SHOR, E.; PERLIN, D. S. Coping with Stress and the Emergence of Multidrug Resistance in Fungi. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 3, 2015.
- SILVA-ROCHA, W. P.; AZEVEDO, M. F.; CHAVES, G. M. Epidemiology and fungal species distribution of superficial mycoses in Northeast Brazil. **Journal De Mycologie Médicale**, v. 27, n. 1, p. 57-64, 2017.
- SIMÕES, C. M. O.; SPITZER. Óleos voláteis. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 6. ed, 2007.
- SIMPANYA, M. F. Dermatophytes: their taxonomy, ecology and pathogenicity, In: KUSHWAHA, K. S.; GUARRO, J. (ed.). *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*. **Revista Iberoamericana de Micología**, , p. 1-12, 2000.
- SOMENZI, C. C.; RIBEIRO, T. S.; MENEZES, A. Características particulares da micologia clínica e o diagnóstico laboratorial de micoses superficiais. **NewsLab**. 2006;77:106-18.
- THAKUR, R. Spectrum of dermatophyte infections in Botswana. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 8, p. 127-33, 2015.
- TURCHIN, I.; BARANKIN, B.; ALANEN, K. W.; SAXINGER, L. Dermatophyte infection (*tinea*). **Canadian Family Physician**, v. 51, p. 499-501, 2005.
- UGHACHUKWU, P. O.; UNEKWE, P. C. Efflux pump-mediated resistance in chemotherapy. **Annals of Medical and Health Sciences Research**. v. 2, n. 2, p 191-198, 2012.
- VAN MINNEBRUGGEN, G.; FRANÇOIS, I. E. J. A.; CAMMUE, B. P. A.; THEVISSSEN, K.; VROOME, V.; BORGERS, M.; SHROOT, B. A General Overview on Past, Present and Future Antimycotics. **The Open Mycology Journal**, v. 4, p. 22-32, 2010.

- VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 1-26, 2012.
- WATA, A.; WATANABE, Y.; KUMAGAI, N.; KATAFUCHI-NAGASHIMA, M.; SUGIURA, K.; PILLAI, R.; TATSUMI, Y. In vitro and in vivo assessment of dermatophyte acquired resistance to efinaconazole, a novel triazole antifungal. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4920-2, 2014.
- WIEDERHOLD, N.P.; PATTERSON, T.F. What's new in antifungals: an update on the in-vitro activity and in-vivo efficacy of new and investigational antifungal agents. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 28, n. 6, p. 539-45, 2015.
- WISEMAN, D. A.; WERNER, S. R.; CROWELL, P. L. Cell cycle arrest by the isoprenoids perillyl alcohol, geraniol, and farnesol is mediated by p21Cip1 and p27Kip1 in human pancreatic adenocarcinoma cells. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 320, n. 3, p. 1163–1170, 2007.
- WOLDEAMANUEL, Y.; MENGISTU, Y.; CHRYSSANTHOU E, PETRINI B. Clinico-mycological profile of dermatophytosis in a reference centre for leprosy and dermatological diseases in Addis Ababa. **Mycopathologia**, v. 161, n. 3, p. 167–72, 2006.
- WOLDEAMANUEL, Y.; MENGISTU, Y.; CHRYSSANTHOU E, PETRINI B. Dermatophytosis in Tulugudu Is land, Ethiopia. **Medical Mycology**, v. 43, n. 3, p. 79–82, 2006.
- WU, L. C.; SUN, P. L.; CHANG, Y. T. Extensive deep dermatophytosis cause by *Trichophyton rubrum* in a patient with liver cirrhosis and chronic renal failure. **Mycopathologia**, v. 176, n. 5-6, p. 457-462, 2013.
- ZHANG, Z.; YANG, T.; NA MI, WANG, Y.; LI, G.; WANG, L.; XIE, Y. Antifungal activity of monoterpenes against wood white-rot fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 106, p. 157-160, 2016.
- NATHALIA N. R. CARDOSO, CELUTA S. ALVIANO, ARIE F. BLANK, MARIA TERESA V. ROMANOS, BEATRIZ B. FONSECA, SONIA ROZENTAL, IGOR A. RODRIGUES, AND DANIELA S. ALVIANO. Synergism Effect of the Essential Oil from *Ocimum basilicum* var. Maria Bonita and Its Major Components with Fluconazole and Its Influence on Ergosterol Biosynthesis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2016.