

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

Dissertação de Mestrado

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA TERBINAFINA, GRISEOFULVINA E
SAPONINAS EXTRAÍDAS DE *Chenopodium quinoa* CONTRA
ISOLADOS DE DERMATÓFITOS MULTIRRESISTENTES**

Aline Jacobi Dalla Lana

Porto Alegre-RS, 2014

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

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA TERBINAFINA, GRISEOFULVINA E
SAPONINAS EXTRAÍDAS DE *Chenopodium quinoa* CONTRA ISOLADOS DE
DERMATÓFITOS MULTIRRESISTENTES**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação por
**ALINE JACOBI DALLA
LANA** para obtenção do
TÍTULO DE MESTRE em
Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. George González Ortega

Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre Fuentesfria

PORTO ALEGRE, 2014

Dissertação apresentada ao 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 27 de março de 2014, pela banca examinadora constituída por:

Letícia Scherer Koester

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Valquiria Linck Bassani

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Mônica Freiman de Souza Ramos

Universidade Federal do Rio de Janeiro

CIP - Catalogação na Publicação

Dalla Lana, Aline
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA TERBINAFINA,
GRISEOFULVINA E SAPONINAS EXTRAÍDAS DE *Chenopodium*
quinoa CONTRA ISOLADOS DE DERMATÓFITOS
MULTIRRESISTENTES / Aline Dalla Lana. -- 2014.
116 f.

Orientador: George Ortega.
Coorientador: Alexandre Fuentefria.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Terbinafina. 2. Griseofulvina. 3. Dermatófitos resistente. 4. reversão da resistência. 5. complexação molecular. I. Ortega, George, orient. II. Fuentefria, Alexandre, coorient. III. Título.

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

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LDG) e no Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Farmácia UFRGS; Análises complementares foram realizadas na Central Analítica do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS.

*Dedico esse trabalho a minha querida família
Meus pais Vera Regina e Alcir José (in memoriam),
minha irmã Aloma e ao meu noivo Daniel
Pelo amor incondicional e apoio*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao meu orientador Professor Dr. George G. Ortega pela oportunidade oferecida, pela dedicação a este trabalho, por ouvir com interesse as minhas questões, dúvidas e problemas. Muito obrigada pelos ensinamentos e pela confiança.

Ao Professor Dr. Alexandre M. Fuentesfria, meu co-orientador, pela forma como me recebeu no laboratório, pelos ensinamentos, orientações e sugestões neste trabalho, obrigada.

Às minhas amigas do laboratório de Micologia aplicada, pelo carinho, amizade, pela ajuda nos experimentos e as discussões, junto sempre com uma boa dose de risadas. Agradeço a vocês por tudo, pois juntas aprendemos e pelos bons momentos compartilhados que tornaram a execução deste trabalho tão especial, é um prazer trabalhar com vocês, essa convivência vai deixar saudades e boas recordações. Em especial gostaria de agradecer a uma grande amiga, Bruna Pippi, que sempre me ajudou nos momentos difíceis, me apoiando e aconselhando, muito choramos e rimos no decorrer desses anos de amizade. Obrigada.

Ao pessoal do LDG gostaria de agradecer pelo apoio, motivação e pelas discussões valiosas sobre o conteúdo deste trabalho. Mais do que colega, Renata M. Cougo, pela amizade sincera que conquistamos, pelo apoio em todas as situações e experimentos, pela ótima convivência diária que deixará saudade e ficará na memória. Obrigada.

Ao meu noivo, Daniel Andrey Knoener de Ramos, meu eterno agradecimento pelo seu valioso apoio e compreensão que foram importantes em todos os momentos deste trabalho. Muito obrigado pelas conversas e palavras de coragem nos momentos mais difíceis, bem como a força transmitida.

Aos meus Pais, Alcir (in memoria) e Vera Dalla Lana, a quem devo tudo aquilo que sou, meu profundo agradecimento pelo amor e apoio incondicional. Minha mãe, por ser um modelo de coragem e confiança, pela ajuda na superação dos obstáculos que surgiram ao longo desta caminhada, dedico esta dissertação a você. Muito Obrigada, Amo vocês.

Às minhas Irmãs, em especial Aloma Dalla Lana, pela forma como me acompanharam e ajudaram na conclusão de mais uma etapa da minha formação, sem vocês nada disso seria possível. Obrigada.

O meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

RESUMO

As dermatofitoses ou micoses cutâneas são infecções causadas por dermatófitos, fungos que apresentam características morfológicas e fisiológicas especializadas. Apesar dos avanços na terapia antifúngica, a incidência de micoses cutâneas tem aumentado. Entre as várias razões para isso, duas causas merecem destaque: o crescente número de indivíduos imunossuprimidos, e a crescente resistência aos antifúngicos. Além disso, resistência a múltiplos antifúngicos tem se revelado como um sério problema no setor da saúde pública. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antifúngico de duas frações purificadas de saponinas de *Chenopodium quinoa* e analisar o potencial sinérgico *in vitro* da associação de griseofulvina (GF) e terbinafina (TF) contra 23 isolados de *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *T. rubrum*. Os testes de susceptibilidade foram realizados segundo a CLSI (M38-A2), seguindo o método de microdiluição. Apesar de já existir relato de saponinas com atividade antifúngica, as duas frações purificadas das saponinas de quinoa testadas, FQ70 e FQ90, não demonstraram efeito inibitório sobre os fungos dermatófitos, mesmo quando combinadas com a GF e a TF. O sinergismo da GF com a TF baseia-se no fato de ambos antifúngicos apresentarem mecanismos de ação diferentes. O teste de susceptibilidade com isolados susceptíveis e resistentes, pelo método do *checkerboard*, mostrou que em 70% dos casos a combinação apresentou aditividade. Mais ainda, a associação de GF e TF foi capaz de reverter a multirresistência em dois isolados. Os dados do teste com MTT revelaram que o percentual de dano na hifa era maior para a combinação do que o observado com GF e TB isoladamente. A associação também provocou alterações evidentes na morfologia e na composição química do micélio, corroborando com as observações de dano celular *in vitro*. A análise por DSC e FT-IR indicam a ocorrência de interação molecular entre os dois antifúngicos. A formação de diferentes hábitos cristalinos, observada pela análise por MEV da mistura de ambos fármacos, tende a confirmar essa hipótese, sem descartar o surgimento de formas polimórficas.

Palavras chave: *Chenopodium quinoa*, terbinafina, griseofulvina, multirresistência, antifúngicos, DSC, FT-IR, interação molecular.

ABSTRACT

Antifungal activity terbinafine, griseofulvin and saponins extracted from *Chenopodium quinoa* against multi-resistant isolates of dermatophytes

Dermatophytoses, also called cutaneous mycoses, are infections caused by dermatophytes, fungi that have specialized morphological and physiological characteristics. In despite of the advances in the current antifungal therapy, the incidence of cutaneous mycoses has increased in past years. There are many reasons for this, but two causes deserve attention: the growing number of immunocompromised individuals, and resistance to antifungal agents. Furthermore, resistance to multiple antifungals has been considered as the major problem in the public health sector. This study aimed to evaluate the antifungal potential of two purified fractions of saponins of *Chenopodium quinoa* and the *in vitro* potential synergism of griseofulvin (GF) and terbinafine (TF) against 23 isolates dermatophytes of the genera *Microsporum canis*, *M. gypseum* *Trichophyton mentagrophytes* and *T. rubrum*. Susceptibility tests were performed according to the CLSI Norm M38-A2, following the method of broth microdilution. Though already exists reports about the antifungal activity of saponins, the two saponins of purified factions from quinoa, and FQ70 FQ90, tested showed no inhibitory effect on dermatophyte fungi, even when combined with GF and TF. The synergistic potential GF and TF was postulated considering that both antifungal drugs act by different mechanisms of action. The test of susceptibility in susceptible and resistant isolates by the checkerboard method revealed an additive effect in that 70% of the isolates. Noteworthy, the GF-TF association was able to reverse the multi-drug-resistance in two isolates. In that case, data from the MTT test evidenced that percentage of damage of hyphae induced by the GF-TF association was greater than that observed in monotherapy. Moreover, it also caused significant alterations in the morphology and chemical composition of the mycelium. The analysis of the freeze-dried mixture of GF and FT by DSC and FT-IR allowed the detection of a manifest molecular interaction between the two antifungals. The formation of different crystal habits observed by SEM analysis of the mixture of both drugs tends to endorse this hypothesis, but, without confirming the occurrence of genuine polymorphic forms.

Keywords: *Chenopodium quinoa*, terbinafine, griseofulvin, multi-drug-resistance, antifungal, molecular interaction, DSC, FT-IR.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

- Tabela 1. Exemplos de saponinas com atividade antifúngica. 46
- Tabela 2. Isolados clínicos utilizados para o ensaio de suscetibilidade frente as frações de quinoa 56
- Tabela 3. Atividade sinérgica da associação de TF ou GF com as frações FQ70 e FQ90 testada espécies de dermatófitos selecionadas 57

Capítulo 2

- Table 1 -Minimum inhibitory concentration (MIC) values and minimum fungicidal concentration (MFC) of griseofulvin (GF) and terbinafine (TF) against of the dermatophytes isolates. 75
- Table 2 -Fractional inhibitory concentration index(CIFI) and type of interactionobtained for hyphaeby testing the GF-TF mixture, after the checkerboard microdilution method. 76
- Table 3 -Percent cell damage after treatment with terbinafine and griseofulvin, alone and combined, expressed in percentage (%) and resulting interaction effect. 77

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Diferenciação entre os gêneros segundo as estruturas de reprodução assexuada. A) Epidermophyton B) Microsporum e C) Trichophyton. 24
- Figura 2. Modelo de manutenção da infecção proposto para dermatófitos, regulada pela secreção de enzimas dependendo do pH do meio (Fonte: CERVELATTI *et al.*, 2004)..... 27
- Figura 3. Representação esquemática da bomba de efluxo ABC e arranjo dos domínios dos transportadores ABC (Fonte: CANNON *et al.*, 2009)..... 32
- Figura 4. Esquema de como a célula desenvolve a resistência por bomba de efluxo e as quadros maneiras de superar essa resistência (Fonte: CANNON *et al.*, 2009). 33
- Figura 5. Estrutura química da griseofulvina e impurezas relatadas. 35
- Figura 6. Estrutura química Terbinafina..... 36

Capítulo 2

- Figure 1 - Cellular damage expressed in percentage of the antifungal alone and of the combination of them. **A)** Cellular Damage of the TME 16 isolated resistant to both antifungals front the combination of griseofulvin (GF) and terbinafine (TF) at concentrations below the Minimum inhibitory concentration (MIC); **B)** Cellular damage of the TME 32 isolated sensitive to both antifungals front the combination of GF and TF at concentrations below MIC. Different letters above the cell damage represents a statistically significant difference ($p < 0.05$);..... 79
- Figure 2 - Photographs of optical microscopy showing the alteration of fungal structures of *T. mentagrophytes* (TME 34) drug-resistant after treatment to GF and TF alone and combined, at concentrations below the respective MIC values: (A) no drug control; (B) GF alone ($32 \mu\text{g mL}^{-1}$); (C) TF alone ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$); (D) GF ($32 \mu\text{g mL}^{-1}$) with TF ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$). Photographs of optical microscopy the hyphae *M. gypseum* (MGY 48) isolated sensitive to both antifungals after treatment GF and TF alone and combined at concentrations below MIC: (E) no drug control; (F) GF alone ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$); (G) TF alone ($0.06 \mu\text{g mL}^{-1}$); (H) TF ($0.06 \mu\text{g mL}^{-1}$) with GF ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$). 80
- Figure 3 -FTIR spectra of the mycelium of the multi-resistant isolated *T. mentagrophytes* TME 34 after different treatments: (A) mycelium untreated - control, (B, C, D and E) mycelia treated: (B) with $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ of TF; (C) $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ GF; (D) GF-TF mixture in 1:6ratio; (E) GF-TF mixture in 1:12 ratio. All

concentrations used for treatment of fungi were below the MIC. Band absorptions at 3700–2996 cm^{-1} was attributed to O–H bond vibrations from carboxyl, hydroxyl or phenol groups, and amides N–H vibrations; band absorptions at 2996–2800 cm^{-1} was ascribed to lipids with functional CH group; band absorptions at 1800–1485 cm^{-1} to proteins with functional groups amides I and II; the peak set at 1485–1185 cm^{-1} to functional CH_2 and CH_3 groups, as well as phosphate compounds with functional group P–O; and the peak set at 1185–900 cm^{-1} range to polysaccharides with functional groups C–O–C and C–O–P. 81

Figure 5 - DSC-calorimetry thermograms of (A) griseofulvin alone; (B) terbinafine alone; (C) freeze-dried mixture of TF and GF in the molar ratio of 1:3; (D) freeze-dried mixture of TF and GF in the molar ratio of 1:6; (E) freeze-dried mixture of TF and GF in the molar ratio of 1:12. The mixture ratios correspond to of the mixtures correspond to that had the best antifungal activity by the checkerboard assay. 83

Figure 6 - FTIR-spectra of (A) griseofulvin alone; (B) terbinafine alone; (C) freeze-dried mixture of TF and GF in the molar ratio of 1:6. Mixture ratios was chosen according to the concentrations that had the best antifungal activity by the *in vitro* checkerboard assay. 84

Figure 7 - Photomicrographs obtained by scanning electron microscopy of (A) griseofulvin alone; (B) terbinafine alone; (C) freeze-dried mixture of TF and GF in the molar ratio of 1:6, (D) freeze-dried precipitate of mixture of TF and GF. Mixture ratios was chosen according to the concentrations that had the best antifungal activity by the *in vitro* checkerboard assay. 85

Figure 9. Percentage of isolated cell damage measured by assay checkerboard with MTT front of GF and TF alone and in combination. The horizontal axis shows the concentration of GF and the depth axis shows the concentration of TF. The vertical axis represents cell damage. The code of the isolate is shown above each graph. Different letters represents results statistically different, to p value < 0.05 99

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC - *ATP-binding Cassete*

ANOVA - *Analysis of Variance*

ABD - ágar Batata dextrose

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CIF - concentrações inibitórias fracionadas

CLAE-PDA - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Detector de Arranjo de Fotodiodos

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DSC - *Differential Scanning Calorimetry*

DMSO - dimetilsulfóxido

ERG24 - Δ 7,8- isomerase

ERG2 - Δ 14-redutase

FIC - *Fractional Inhibitory Concentration*

FICI - *Fractionary Inhibitory Concentration Index*

FT-IR - *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

GF – Griseofulvina

HIV – Vírus da imunodeficiência adquirida

ICIF - Índice de concentração inibitória fracionada

MDR1 - *Multi Drug Resistance 1*

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MIC - Concentração Inibitória Mínima

MFC - Concentração Fungicida Mínima

MOPS - *3-N-morpholino Propanesulfonic Acid*

MTT - *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*

SE - *squalene epoxidase*

TF – Terbinafina

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA	17
OBJETIVOS	21
OBJETIVO GERAL	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
REFERENCIAL TEÓRICO.....	23
DERMATOFITOS	24
AGENTES ETIOLÓGICOS DAS MICOSES CUTÂNEAS E ASPECTOS DE INCIDÊNCIA	25
MECANISMOS DA INFECÇÃO FÚNGICA.....	26
CLASSES DE ANTIFÚNGICOS	27
MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS	30
GRISEOFULVINA	33
A ASSOCIAÇÃO DE FÁRMACOS COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA.....	37
NOVOS MODELOS MOLECULARES DE ORIGEM NATURAL.....	39
SAPONINAS.....	40
CAPÍTULO 1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE FRAÇÕES DE SAPONINAS DE CHENOPODIUM QUINOA WILLD	43
1. INTRODUÇÃO.....	44
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	45
3. MATERIAL E MÉTODOS	51
4. RESULTADOS.....	56
5. DISCUSSÃO	58
6. CONCLUSÃO	59
7. REFERENCIAS.....	60
CAPITULO 2. ARTIGO.....	63
ANEXO	97
DISCUSSÃO GERAL	101
CONCLUSÕES	109
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	111

APRESENTAÇÃO

De acordo com as normas vigentes no Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a presente dissertação de mestrado foi redigida na forma de capítulos e encontra-se organizada da seguinte forma:

- Introdução e Relevância do Tema
- Objetivos: geral e específicos
- Referencial teórico
- Capítulo 1: Avaliação da atividade antifúngica e sinérgica das frações de saponinas de *Chenopodium quinoa Willd*
- Capítulo 2: Atividade sinérgica e reversão da resistência de dermatófitos multirresistentes à griseofulvina e terbinafina, apresentado na forma de encarte de artigo a ser submetido a publicação e com anexos pertinentes
- Discussão Geral
- Conclusões gerais

INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA

Durante a última década, micoses cutâneas tornaram-se cada vez mais comuns, afetando aproximadamente 20-25% da população mundial (HAVLICKOVA *et al.*, 2008). Entre os fatores que têm contribuído para o aparecimento de dermatofitoses e infecções fúngicas generalizadas, causadas por agentes oportunistas, cabe mencionar o aumento de pacientes em quimioterapia ou imunossuprimidos e infectados com HIV. Não menos importante, contudo, é a resistência decorrente da automedicação e do uso irracional e intensivo de antifúngicos intensivamente na terapia institucional, como terbinafina, itraconazol, cetocanazol e fluconazol (LAKSHMIPATHY; KANNABIRAN, 2010).

A resistência simultânea a múltiplos fármacos antifúngicos tem se revelado um problema emergente e grave no setor da saúde pública. Para algumas dermatofitoses, especificamente, constata-se um número crescente de relatos de falhas terapêuticas e de tempos de tratamento cada vez mais longos. Igualmente, casos de recorrência, maior incidência de toxicidade e aumento dos custos de tratamento têm sido também objeto de relatos sobre o tema (YIN, XU ; LUO, 2012; BAATH, HONG; SATTAR, 2006). Nesse mesmo contexto, há relatos sobre o incremento de múltipla-resistência para diferentes cepas de bactérias e fungos não dermatófitos (ALMEIDA JÚNIOR *et al.*, 2014; D'COSTA, *et al.*, 2011; JOSEPH *et al.*, 2010; SAHA *et al.*, 2009).

Uma alternativa frequentemente utilizada para esses casos refratários é a terapia de combinação antifúngica (HENAO-MARTÍNEZ *et al.*, 2013; GROLL *et al.*, 2010; JOHNSON *et al.*, 2004). Entre os regimes de combinação antifúngicos mais utilizados cabe destacar a estratégia de combinar terbinafina com itraconazol e amorolfina, em função do potencial sinergismo decorrente dos diferentes mecanismos de ação desses fármacos. Especificamente, itraconazol e amorolfina alteram a função da membrana celular, enquanto que a terbinafina impede a biossíntese do ergosterol, com acúmulo de metabólitos tóxicos para o fungo (GUPTA *et al.*, 2013a; TAMURA *et al.*, 2013).

Face ao acima apresentado, o presente trabalho visou estudar a atividade antifúngica da fração saponosídica de sementes de *Chenopodium quinoa*, além de também avaliar a atividade sinérgica dessas frações combinadas com a terbinafina ou griseofulvina. Em virtude das saponinas apresentarem a particularidade de formarem micelas, acreditava-se que as frações fossem capazes de gerar essas estruturas e assim aprimorar a atividade antifúngica quando associadas aos medicamentos. Provavelmente essas micelas poderiam proteger o fármaco dos mecanismos de resistência dos fungos, auxiliando na sua atividade.

Além disso, esta dissertação destinou-se também em avaliar a o potencial sinérgico da associação de terbinafina e griseofulvina, mediante a testes de susceptibilidade de isolados clinicamente relevantes, inclusive isolados resistentes. Uma vez que a combinação destes antifúngicos não é relatada na literatura, portanto o trabalho focou em estudar o sinergismo e a potencial reversão da resistência (constatada em testes preliminares), sobretudo em dermatófitos multirresistentes.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antifúngico de duas frações de saponinas de *Chenopodium quinoa* e analisar o efeito sinérgico *in vitro* da associação de griseofulvina e terbinafina contra isolados de micoses superficiais causadas por espécies relevantes de dermatófitos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o perfil de susceptibilidade de isolados de micoses superficiais, frente a frações enriquecidas de saponinas de quinoa e dos antifúngicos griseofulvina e terbinafina;
- Determinar a concentração fungicida mínima (CIM) para essas frações e esses fármacos sobre isolados de cada espécie;
- Avaliar o efeito da associação entre a griseofulvina e a terbinafina contra isolados de dermatófitos, selecionados a partir dos valores de CIM;
- Avaliação do efeito da associação de antifúngicos na morfologia de células fúngicas multirresistentes a griseofulvina e terbinafina;
- Analisar a alteração na composição química do micélio fúngico após tratamento com griseofulvina e terbinafina em associação;
- Avaliar interações físico-químicas entre griseofulvina e terbinafina por meio de análises de calorimetria exploratória diferencial, espectrofotometria no infravermelho e microscopia eletrônica de varredura, como forma de fundamentar mecanismos de ação que ocorrem fora da célula fúngica.

REFERENCIAL TEÓRICO

DERMÁTOFITOS

Os dermatófitos são fungos filamentosos hialinos e septados que compreendem um grupo de microorganismos com características morfológicas e fisiológicas especializadas, tidos como os agentes causais das denominadas tineas. Esses fungos possuem a capacidade de digerir a queratina da pele, cabelo e unhas, tanto em humanos quanto em animais, e utilizá-la como nutriente durante a instalação da infecção (AJELLO, 1968). Epidemiologicamente, três gêneros fúngicos predominam nas dermatofitoses: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* (MATSUMOTO E AJELLO, 1987).

O gênero *Epidermophyton* apresenta os macroconídios amplamente clavados com extremidades arredondadas e paredes tipicamente lisas e finas. Esses conídeos exibem um a nove septos, e normalmente são abundantes, ao contrário dos microconídeos que são ausentes (Figura 1A). Este gênero tem apenas duas espécies conhecidas: *E. stockdaleae* e *E. Floccosum*, sendo a última a única considerada patogênica. O gênero *Microsporum*, apresenta macroconídios sésseis e clavados, geralmente dispostos ao longo das hifas isoladamente, de paredes grossas, verrucosas, de forma fusiforme, com 1 a 15 septos (Figura 1B). Finalmente, o gênero *Trichophyton* caracteriza-se por poucos macroconídios alongados, em forma de lápis, clavados, fusiformes ou cilíndricos (Figura 1C). De modo geral, esses macronídeos apresentam paredes lisas e finas, com um a doze septos, isolados ou em grupos. Diferentemente dos outros dois gêneros, há abundantes microconídios, que podem ser globosos, piriformes, clavados ou sésseis, dispostos isoladamente ao longo dos lados das hifas (WEITZMAN ; SUMMERBELL, 1995; AJELLO, 1968).

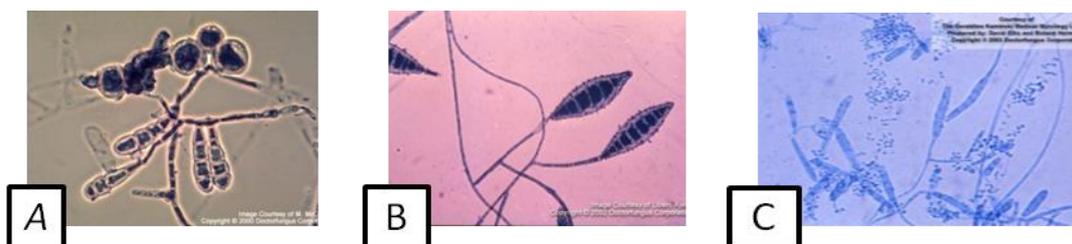


Figura 1. Diferenciação entre os gêneros segundo as estruturas de reprodução assexuada. A) *Epidermophyton* B) *Microsporum* e C) *Trichophyton*.

As espécies de dermatófitos são também divididas em zoofílicos, geofílicos ou antropofílicos, dependendo do seu habitat primário (AJELLO, 1968). O grupo dos geofílicos apresenta como característica primária a capacidade de manter sua viabilidade em solos ricos em resíduos de queratina humana ou animal.

Por sua vez, os zoofílicos se adaptaram em relações de parasitismo em animais que mantêm um contato próximo com o solo, sendo responsáveis por cerca de 30% das dermatofitoses humanas, provocando infecção com inflamação aguda.

O subgrupo dos dermatófitos antropofílicos são responsáveis por 70% das dermatofitoses, causando infecção crônica própria de uma adaptação preferencial ao hospedeiro humano (BRILHANTE *et al.*, 2005; WHITE *et al.*, 2008). Ainda que apresentem uma distribuição cosmopolita, sua distribuição e perfil epidemiológico são influenciados por condições geoclimáticos e sociais. Os perfis epidemiológicos são variados, segundo fatores regionais, estacionais, de faixa etária, frequência de contato com animais e da exposição a locais públicos (AQUINO, CONSTANTE; BAKOS, 2007).

AGENTES ETIOLÓGICOS DAS MICOSES CUTÂNEAS E ASPECTOS DE INCIDÊNCIA

As micoses cutâneas são as infecções fúngicas mais comuns e são causadas principalmente por dermatófitos. Essas infecções são restritas a camada córnea da epiderme, devido à incapacidade que os fungos têm de penetrar tecidos profundos e órgãos do hospedeiro. As micoses causadas especificamente por dermatófitos são denominadas de *tineas* ou *dermatofitoses* e caracterizam-se segundo o local atingido, por exemplo, *tinea capitis* (no couro cabeludo), *tinea corporis* (na pele glabra e tronco), *tinea cruris* (na virilha), *tinea ungueal* (nas unhas), *tinea barbae* (na barba e bigode), *tinea manuum* (na mão) e *tinea pedis* (nos pés) (DEI CAS E VERNES, 1986).

Em termos de prevalência local, o número de micoses por *Trichophyton rubrum* em Porto Alegre (62,2%) foi maior do que a observada para *Trichophyton mentagrophytes* (20,3%), *Microsporum canis* (5,7%) e *M. gypseum* (1,4%) (AQUINO, CONSTANTE; BAKOS, 2007). Esses números corroboram trabalhos anteriores

realizados em Porto Alegre e interior do Rio Grande do Sul (MEZZARI, 1998). Ao mesmo tempo, evidenciam diferentes taxas de incidência dessas espécies em outras regiões da União, como no Pará e no nordeste, (SILVEIRA-GOMES *et al.*, 2013; MATOS ; MARIANO, 2010) ou a prevalência de outras espécies, como *M. canis* em âmbito nacional, (NURIMAR, TIYOMI ; MARIA DA GLÓRIA, 2001), e *T. tonsurans* na Amazônia (CORTEZ *et al.*, 2012).

Esse perfil epidemiológico varia entre países e regiões do planeta, mostrando ser variável segundo a época histórica considerada. Por exemplo, a forma clínica mais prevalente é *tinea capitis* e o agente etiológico mais frequente na Europa é *M. canis* (FRANGOULIS, ATHANASOPOULOU ; KATSAMBAS, 2004), enquanto que nos Estados Unidos é o *T. tonsurans*, e não mais *Microsporum* spp, como relatado para o início do século XX (GHANNOUM *et al.*, 2000; GINTER-HANSELMAYER *et al.*, 2007).

MECANISMOS DA INFECÇÃO FÚNGICA

O mecanismo de infecção por dermatófitos envolve três etapas (ESQUENAZI *et al.*, 2004):

- a) rompimento da camada intacta de queratina e a superação do mecanismo de defesa do hospedeiro;
- b) adesão decorrente da expressão de glicoproteínas adesinas que se ligam a resíduos de manose e galactose na superfície das células;
- c) e início da germinação dos artroconídios favorecendo a penetração das hifas na pele.

Após a instalação do fungo no extrato córneo da epiderme, esse passa a utilizar as macromoléculas do hospedeiro como fonte de carbono, enxofre, nitrogênio e fósforo, através da secreção de enzimas hidrolíticas como, nucleases, lipases, proteases e queratinases (GIDDEY, MONOD, *et al.*, 2007b). Esse processo enzimático é o maior fator de virulência e a atividade queratinolítica está intimamente ligada a

patogenicidade dos dermatófitos (OGAWA *et al.*, 1998). Devido ao favorável pH ácido da pele, o agente patogênico expressa a síntese de proteases não específicas e queratinases. Entretanto, na sequência do processo, a utilização do substrato e consequente produção de aminoácidos ocorre a alcalinização do meio, favorecendo a atividade de queratinases com atividade ótima em pH alcalino, permitindo a manutenção da infecção (CERVELATTI *et al.*, 2004) (Figura 2).

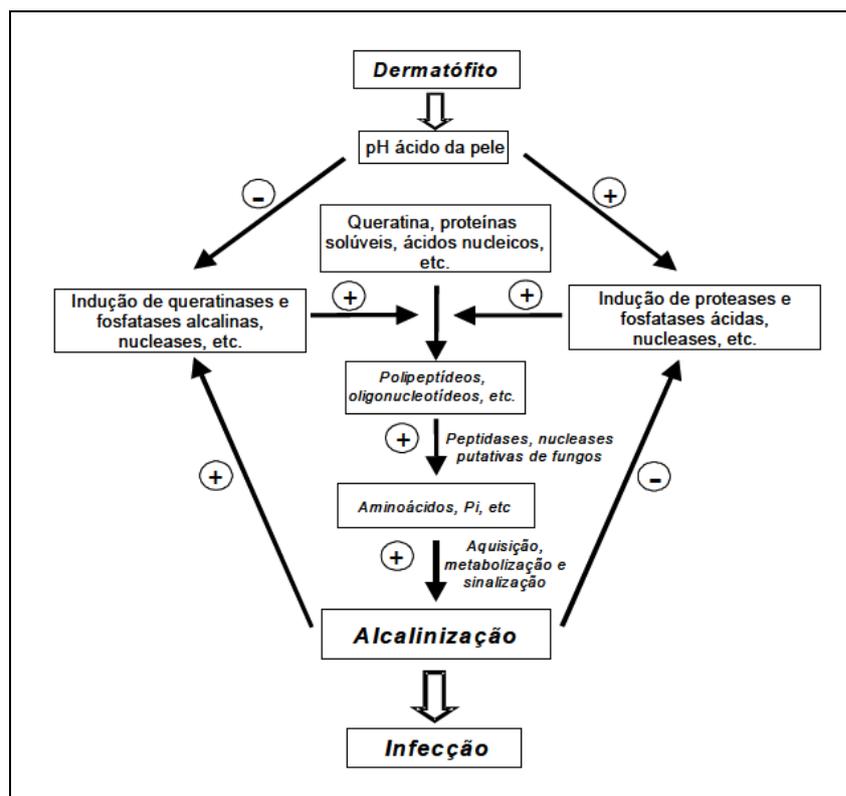


Figura 2. Modelo de manutenção da infecção proposto para dermatófitos, regulada pela secreção de enzimas dependendo do pH do meio (Fonte: CERVELATTI *et al.*, 2004).

CLASSES DE ANTIFÚNGICOS

Os antifúngicos mais frequentemente utilizados na clínica pertencem a oito classes de compostos: azóis (fluconazol, cetoconazol, itraconazol, entre outros.), poliênicos (anfotericina B e nistatina), não poliênicos (griseofulvina), nucleosídeos pirimidínicos (fluocitosina), equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina), alilaminas (terbinafina, butenafina e naftifina), ciclopiroxolamina, morfollinas (amorolfina).

Os azóis possuem um amplo espectro de atividade antifúngica baseado no bloqueio da síntese do ergosterol, inibição da atividade da enzima esterol 14- α -demetilase, com a consequente alteração da permeabilidade da membrana celular. Contudo, esta classe é fungistática e as células persistentes, principalmente em organismos imunossuprimidos, conduzem à seleção positiva de mutantes resistentes. Sua toxicidade deve-se ao seu mecanismo de ação, alguns sendo hepatotóxicos (ODDS, BROWN; GOW, 2003; ONYEWU *et al.*, 2003).

Os polienos pertencem a uma classe de substâncias formadas por átomos de carbono com duplas ligações não saturadas em sequência, conformando uma estrutura cíclica complexa. Essa classe de substâncias liga-se diretamente ao ergosterol presente na membrana dos fungos formando poros, o que altera a permeabilidade celular, acarretando assim perda de componentes citoplasmáticos e morte celular (GHANNOUM; RICE, 1999). Polienos possuem uma maior afinidade pelo ergosterol do que pelo colesterol (devido à sua conformação espacial). Apesar o predomínio desse primeiro esterol na composição da membrana fúngica, esta classe de antifúngicos também se liga ao colesterol da membrana de células humanas. Além disso, anfotericina B causa problemas renais, sendo utilizada preferencialmente por via intra-venosa ou intra-tecal. O efeito fungicida também é atribuído a danos oxidativos causados na célula pelo polieno (ODDS *et al.*, 2003).

Griseofulvina é o principal representante da classe dos antifúngicos não poliênicos. O seu mecanismo de ação baseia-se na inibição da divisão celular ao interagir com a biossíntese dos microtúbulos e rompendo o fuso mitótico. Também atua como um inibidor da síntese do ácido nucleico (LACAZ *et al.*, 2002). É utilizada por via oral, sendo indicada quando a terapia tópica se revela insuficiente (LACAZ *et al.*, 2002), a griseofulvina apresenta hepatotoxicidade moderada (KNASMMULLER *et al.*, 1997).

O antifúngico 5-fluorocitosina é um derivado fluorado da citosina, primariamente destinado à administração oral, em associação com a anfotericina B, no tratamento de candidiases e criptococoses. Este fármaco é transformado pela célula

fúngica em um antimetabólito da uracila, inibindo a síntese proteica e a enzima timidilato sintase, o que leva ao bloqueio da síntese de DNA, entretanto, o desenvolvimento de resistência pode ser rápido. Mostra pouca toxicidade em humanos, uma vez que a biotransformação em metabólitos de uracila tem pouca relevância em mamíferos. Contudo, os efeitos adversos mais comumente relatados incluem anemia, leucopenia e trombocitopenia (ODDS *et al.*, 2003).

As equinocandinas são lipopeptídeos que apresentam ação diferente dos restantes fármacos antifúngicos. Seu mecanismo de ação está baseado na inibição da síntese do 1,3- β -d-glucano, componente essencial da parede celular de algumas leveduras e fungos filamentosos (ESPINEL-INGROFF, 2009). A inibição da síntese do B-(1,3)-D-glucano origina um duplo efeito, fungistático e fungicida. O efeito fungistático resulta do bloqueio da síntese da parede celular, reduzindo o crescimento do fungo. O efeito fungicida resulta na alteração da integridade na parede celular, que perde a sua resistência mecânica e a sua capacidade de resistir à pressão osmótica, provocando a morte celular (DENNING, 2003).

Alilaminas constituem uma classe de fármacos inibidores biossintéticos do ergosterol, contudo, são química e funcionalmente distintos de outras classes de agentes antifúngicos inibidores do ergosterol (GHANNOUM; RICE, 1999). Terbinafina é o representante mais usado e seu mecanismo de ação tem por base a inibição da enzima esqualeno epoxidase, atuando na formação do precursor do lanosterol. A deficiência em ergosterol e consequente acumulação de esqualeno provocam a ruptura da membrana e a morte da célula (LACAZ *et al.*, 2002; VANDEPUTTE *et al.*, 2012).

Ciclopiroxolamina é uma piridona sintética, usada no tratamento de dermatofitoses e candidíases leves na forma de creme e solução cutânea a 1% ou verniz ungueal a 8% (LEEM *et al.*, 2003). Casos de micoses superficiais de maior gravidade geralmente são tratados por via oral (RICHARDSON; WARNOCK, 2003).

As morfolinas inibem duas enzimas na etapa de biossíntese de ergosterol, Δ 7,8-isomerase (ERG24) e Δ 14-redutase (ERG2) (VANDEPUTTE *et al.*, 2012). Nesta

classe de compostos, destaca-se amorolfina, um fungicida de amplo uso contra fungos dermatófitos. O mecanismo de resistência deste grupo de substâncias ainda é desconhecido (VANDEPUTTE *et al.*, 2012).

MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS

O aumento da incidência de infecções fúngicas e o aparecimento de cepas resistentes estão se tornando cada vez mais frequente, principalmente no ambiente hospitalar (ALMEIDA JÚNIOR *et al.*, 2014).

Vários mecanismos bioquímicos contribuem para desenvolvimento da resistência, entre eles (MARTINEZ-ROSSI *et al.*, 2008):

- a) redução da entrega ou efluxo do fármaco;
- b) modificação metabólica ou degradação do fármaco pela célula;
- c) alterações na interação entre a fármaco e o local alvo ou modificação no próprio local alvo; e
- d) modificações enzimáticas em uma mesma via enzimática.

Essas alterações acontecem através de mutações pontuais, super-expressão da molécula alvo ou, ainda, amplificação do gene. Os mecanismos de resistência mais frequentes em dermatófitos envolvem a diminuição da absorção do fármaco, alterações estruturais em moléculas alvos, aumento no efluxo e resposta ao estresse (MARTINEZ-ROSSI *et al.*, 2008).

Atualmente o *T. rubrum* é o agente antropofílico mais frequentemente isolado e com maior taxa de resistência à medicação tópica (COSTA *et al.*, 2002; VENA *et al.*, 2012). O primeiro caso de resistência clínica foi relatado para uma linhagem de *T. rubrum* refratária ao tratamento com terbinafina, um dos fármacos mais utilizados para o tratamento de dermatofitoses causada por esse agente etiológico (MUKHERJEE *et al.*, 2003). Embora esse isolado tenha sido outrora susceptível a itraconazol, fluconazol e griseofulvina, tem desenvolvido resistência cruzada a outros inibidores da enzima

esqualeno epoxidase, incluindo naftifina, butenafina, tolnaftato e tolclato, sugerindo um mecanismo de resistência vinculado a uma enzima alvo específica. A base deste mecanismo parece envolver mutações nos genes vinculados à expressão da enzima alvo, propiciando alteração no tipo e na sequência de aminoácidos (OSBORNE *et al.*, 2006). Outros autores têm proposto um mecanismo disparado pela combinação de mais de uma mutação, em uma mesma cepa (ROCHA *et al.*, 2002), assim como a superexposição da enzima alvo, baseada na introdução de cópias extra dos genes que codificam a enzima, como visto para os dermatófitos resistentes ao cetoconazol (OSHEROV *et al.*, 2001).

Vários genes foram super-expressos após exposição de dermatófitos a diferentes classes de antifúngicos (acriflavina, fluconazol, griseofulvina, terbinafina) tendo-se proposto que essa super-expressão pode ser uma forma de resposta ao estresse inespecífico (PAIÃO *et al.*, 2007). Esse estresse seria causado pela exposição do fungo a concentrações sub-inibitórias, como observado para griseofulvina (FACHIN *et al.*, 2001).

Os transportadores de efluxo de múltiplos fármacos são proteínas plasmática ou de organelas celulares (KANG *et al.*, 2011), que tem a capacidade de se ligar a uma variedade de compostos químicos diferentes e expulsá-los do interior da célula, ainda que contra um gradiente de concentração. A caracterização de quatro domínios intracitoplasmáticos e outras peculiaridades de estrutura dos transportadores ABC (Fig. 3) são bem descritos na literatura (DE ROSSI *et al.*, 2006). A participação de fatores mutagênicos neste mecanismo de resistência foi observado em um isolado *T. rubrum* resistente simultaneamente a griseofulvina e tioconazol. Em 2006 Cervelatti *et al.* codificam o gene (*TruMDR1*) responsável pela resistência de *T. rubrum* como sendo um transportador “ATP-binding cassette” (ABC).

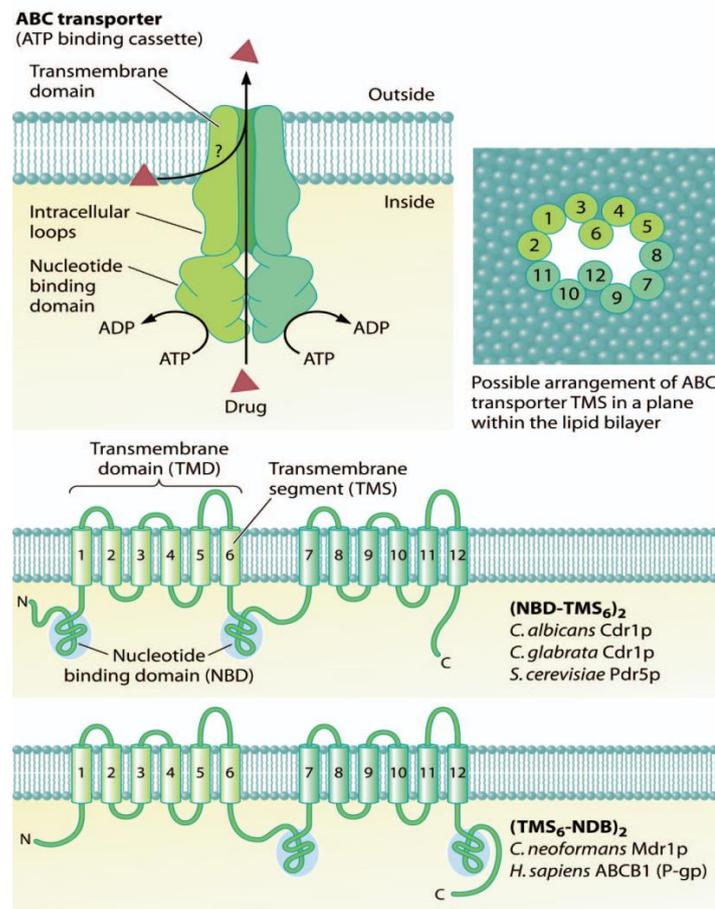


Figura 3. Representação esquemática da bomba de efluxo ABC e arranjo dos domínios dos transportadores ABC (Fonte: CANNON *et al.*, 2009).

Existem quatro principais abordagens para anular os efeitos de efluxo: (a) usar antifúngicos que não são substratos de bombas de efluxo, com estrutura molecular grande o que dificulta a capacidade de entrar no poro para a ligação do fármaco com o transportador (Figura 4, imagem 1); (b) proteger os antifúngicos sujeitos a efluxo mediante de inibidores da bomba de efluxo, como verapamil (Figura 4, imagem 2a e b); (c) destruir a energia da célula necessária para o funcionamento da bomba de efluxo através da redução do potencial de membrana (Figura 4, imagem 3); (d) desenvolver fármacos com taxa aumentada de absorção, alterando assim o equilíbrio entre a absorção e o efluxo (Figura 4, imagem4) (CANNON *et al.*, 2009).

GRISEOFULVINA

Griseofulvina (GF) (Figura 5) é um metabólito secundário produzido pela *Penicillium griseofulvum*, sendo o primeiro antibiótico para o qual se pode afirmar que tem atividade inibidora seletiva para fungos (TRISSEL; OGUNDELE, 2005). É administrado por via oral, sendo o fármaco de escolha para o tratamento das dermatofitoses. Este agente antifúngico sistêmico é o único aprovado pelas autoridades reguladoras (Organização Mundial da Saúde) para o tratamento de *tinea capitis*, nos Estados Unidos e no Reino Unido (TEY *et al.*, 2011). A griseofulvina age inibindo a síntese de ácidos nucleicos e a mitose celular, por interferir na formação do microtúbulos do fuso acromático (GEORGOPAPADAKOU; WALSH, 1996; PAIÃO *et al.*, 2007).

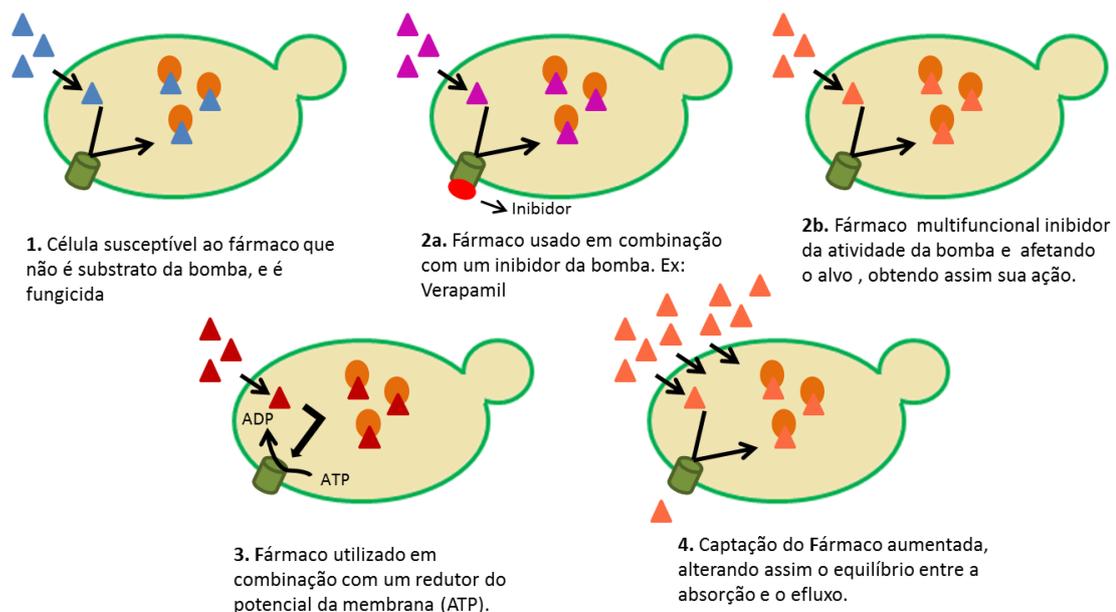


Figura 4. Esquema de como a célula desenvolve a resistência por bomba de efluxo e as quadros maneiras de superar essa resistência.

Os microtúbulos são heterodímeros compostos de duas subunidades de polipeptídeos: α e β -tubulina, que formam um esqueleto celular altamente organizado em todas as células eucariotas, a sua polimerização e despolimerização desempenha um papel chave na divisão celular e crescimento. A polimerização de microtúbulos é

inibida pela griseofulvina, que interagem com β -tubulina impedindo a formação do fuso mitótico por ruptura dessa estrutura, detendo assim a divisão celular e a multiplicação do fungo (SIDRIN *et al.*, 2004).

A griseofulvina apresenta uma baixa solubilidade em água e alta permeabilidade, sendo um fármaco do tipo II na classificação biofarmacêutica dos fármacos (ZHU *et al.*, 2012; FENG *et al.*, 2009).

Cristais de GF caracterizam-se por apresentar uma forte hidrofobia com escassa formação de ligações de hidrogênio com água na superfície do cristal. Assim, o balanço termodinâmico tende a desfavorecer a sua dissolução em água (ZHU *et al.*, 2012).

A existência de polimorfismo em cristais moleculares é um fenômeno bem documentado e mais comum do que se pensava anos atrás (BRITAIN, 2012). Também para GF tem sido relatado polimorfismo, sendo reconhecidas as formas polimorfas II e III (MAHIEU *et al.*, 2012) após fusão da forma cristalina estável. Também o meio solvente e o método de cristalização tem forte influência no hábito cristalino, entretanto, sem afetar termodinamicamente a estrutura cristalina (DE GIOANNIS *et al.*, 2004; JARMER *et al.*, 2005). O processamento tecnológico mediante moagem de formas cristalinas favorecem a obtenção de produtos com maior percentual de forma amorfa, maior superfície de contato e menor temperatura de cristalização (TRASI *et al.*, 2010). Pelo contrário, o processo de maceração aquosa da GF amorfa tende a favorecer o aparecimento de formas cristalinas (BRITAIN, 2012).

Como outros antibióticos, griseofulvina é um produto biotecnológico obtido por fermentação. Conseqüentemente, a forma comercial contém metabolitos como impureza, principalmente, declorogriseofulvina, deidrogriseofulvina, diidrogriseofulvina, ácido griseofúlvico, tetraidrogriseofulvina e isogriseofulvina (Figura 5). O teor máximo aceito dessas impurezas é de 0.15 % segundo a Agência Europeia de Medicamentos (EMA). Níveis maiores podem decorrer de processos de degradação por armazenagem, como observados para impurezas 2, 3 e 4 (KAHSAY *et al.*, 2013).

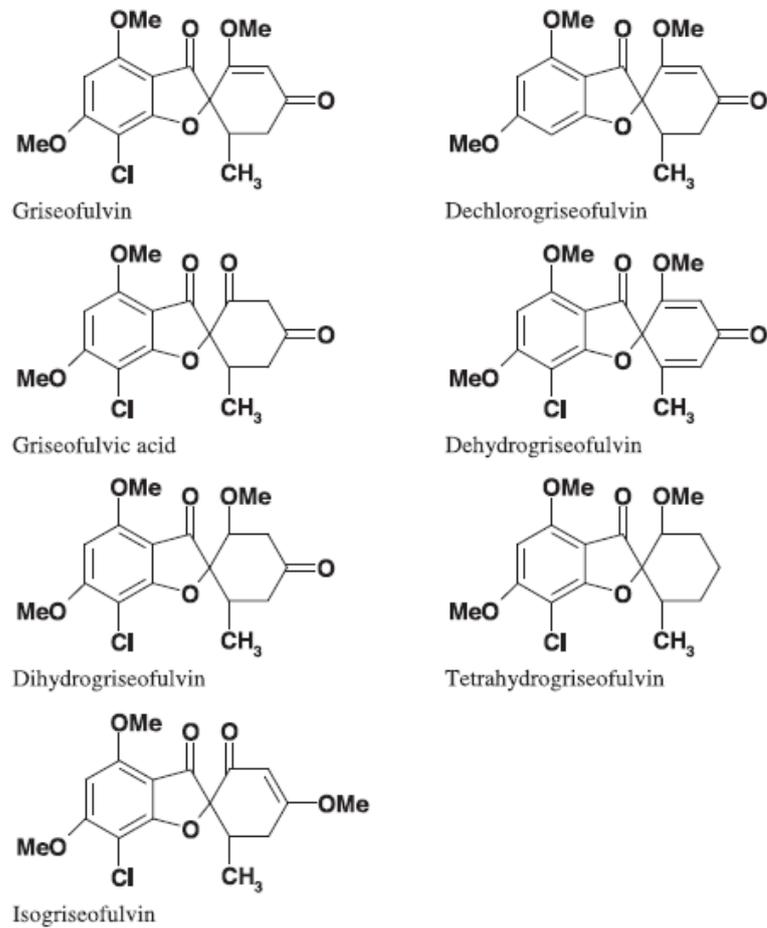


Figura 5. Estrutura química da griseofulvina e impurezas relacionadas (KAHSAY *et al.*, 2013).

TERBINAFINA

Terbinafina (TF) (Figura 6) é uma alilamina sintética com amplo espectro de atividade contra fungos patogênicos da pele, cabelo e unhas, inclusive os dermatófitos dos Gêneros *Tricophyton* e *Microsporum*. Seu mecanismo de ação está baseado na inibição não competitiva da esqualeno epoxidase (FAVRE; RYDER, 1997) e bloqueio a síntese de 2,3-oxidoesqualeno, o que leva ao esgotamento do ergosterol e ao acúmulo do esqualeno, que interfere nas funções da membrana e na síntese da parede celular provocando a inibição do crescimento do fungo (RYDER, 1992).

A distribuição da terbinafina pela pele, em particular, se dá rápida e extensivamente: as altas concentrações encontradas no extrato córneo e nos tecidos adjacentes refletem o alto índice de lipofilia desse fármaco (FLEECE *et al.*, 2004; SIDRIN *et al.*, 2004).

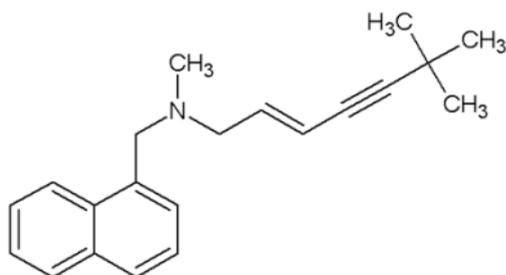


Figura 6. Estrutura química Terbinafina.

A terbinafina é um fármaco que tem baixa toxicidade e potencial teratogênico (BECHTER; SCHMID, 1987). Entretanto, há relatos de hepatotoxicidade induzida terbinafina. (Fernandes *et al.*, 1998; FDA, 1998).

Dados disponíveis na literatura indicam que o solvente de cristalização influencia na morfologia do cristal de TF, devido à interação que ocorre entre soluto-solvente em várias interfaces do cristal. Com isso, vários são os fatores que podem ser afetados, como a cinética de crescimento de cristal, a melhoria ou inibição de crescimento em certas faces cristalinas e arredondamento das interfaces. (BERKOVITCH-YELLIN, 1985).

Cabe salientar ainda, que a morfologia do cristal tem um papel importante no processamento e desenvolvimento de produtos farmacêuticos, uma vez que o habito cristalino influencia nas propriedades físicas, como, a orientação das partículas, a velocidade de dissolução, o fluxo de pó, comportamento de compactação e compressão. Portanto, diferentes taxas de dissolução são esperadas quando ocorre alteração na morfologia do cristal (RASENACK *et al.*, 2003).

Kuminek *et al.* em 2013 descrevem diferentes hábitos cristalinos para a TF dependendo do solvente utilizado no processamento. Quando utilizaram água:etanol na proporção de 1:1 (v / v) observaram uma morfologia do tipo placa. Por outro lado, obtiveram cristais na forma de agulha quando a solução utilizada foi acetato de etila. Além disso, esses autores relatam que os diferentes hábitos cristalinos apresentavam taxa de dissolução distintas, sendo que o cristal em forma de agulha revelou uma menor cinética de dissolução,

A ASSOCIAÇÃO DE FÁRMACOS COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA

A adoção da associação de fármacos como uma estratégia terapêutica responde a várias necessidades levantadas nos últimos anos, como as limitações surgidas de uma elevada toxicidade e a baixa tolerância (MUKHERJEE *et al.*, 2005).

Entretanto, o principal motivo para a proposta de novas estratégias de combinação é a crescente resistência aos antifúngicos. Isso atinge principalmente casos nos quais, devido ao longo período de tratamento e a difícil cura das dermatofitoses, a combinação de medicamentos tópicos, orais e anti-inflamatórios tem sido proposta para aumentar a taxa de cura (GUPTA; COOPER, 2008).

Existem vários mecanismos envolvidos na atividade sinérgica promovida pela combinação de agentes antifúngicos (JOHNSON *et al.*, 2004):

- a) inibição de diferentes etapas de uma mesma via bioquímica que seja vital à sobrevivência do fungo;
- b) aumento da penetração de um dos antifúngicos proporcionada pela ação do outro fármaco;
- c) inibição de proteínas carreadoras, exemplificada pela anfotericina B que inibe a ação de proteínas da membrana plasmática responsáveis pelo efluxo da flucitocina da célula;
- d) inibição simultânea de diferentes alvos celulares.

O critério envolvido na associação de fármacos baseia-se essencialmente nos mecanismos de ação e respectivos alvos terapêuticos dos fármacos em estudo. Porém existe pouco estudo abordando a combinação de fármacos frente às diferentes espécies de dermatófitos. Assim, as combinações mais lógicas seriam aquelas que envolvem fármacos com diferentes mecanismos de ação (NISHI *et al.*, 2009), conforme explicado a seguir:

- A associação *in vitro* de ciclopirox (ativa contra dermatófitos, leveduras e fungos não dermatófitos) e terbinafina (fármaco de escolha contra dermatófitos) mostrou efeitos sinérgico e aditivo em testes de susceptibilidade contra *Trichophyton* spp. (GUPTA; KOHLI, 2003). Pelo contrário, a associação de ciclopirox e itraconazol mostrou ser ineficaz para a maioria dos casos, entretanto, sem que tenham sido observados casos de antagonismo para nenhuma das associações.
- Estudos com cetoconazol, griseofulvina e terbinafina demonstraram a potencialização da atividade fungicida desses três agentes antifúngicos contra *T. mentagrophytes*, quando combinados com amorolfina (POLAK, 2009). Os resultados das associações desses com amorolfina foram sempre mais eficiente em um modelo de combinação do que de monoterapia para dermatofitose. Outros casos de interação clara de sinergismo entre amorolfina e outros antifúngicos é relatada pelo mesmo autor (POLAK, 2009). Resultados similares foram relatados com a combinação de amorolfina e itraconazol, sem qualquer evidencia de antagonismo (TAMURA *et al.*, 2013). Esta combinação apresenta efeito sinérgico ou aditivo *in vitro* sobre a maioria das espécies de dermatófitos.
- A combinação de antifúngicos com outras classes de fármacos, como as estatinas, tem apresentado uma melhor atividade antifúngica por causa do efeito sinérgico, por exemplo, com terbinafina e diferentes azóis. As combinações de cetoconazol-sinvastatina e terbinafina-sinvastatina mostraram uma excepcional atividade antifúngica *in vitro* contra quatro espécies de dermatófitos testadas especificar espécies (NYILASI *et al.*, 2013).

Cabe aqui destacar o fato de os mecanismos de ação da GF e da TF serem intrinsecamente diferentes, o que justifica seu uso com indicações complementares na terapia de varias micoses. Por exemplo, para o tratamento de *tinea capitis* causada por *Microsporum* sp., griseofulvina é mais indicada, promovendo melhor a cura, porém quando o agente etiológico é o *Trichophyton* spp. terbinafina é superior (TEY *et al.*, 2011; GUPTA; DRUMMOND-MAIN, 2013a; PRANTEDA *et al.*, 2013). Já para o tratamento de *tinea pedis* a terbinafina é mais eficaz, requerendo um tempo menor de tratamento, além de ter um custo-benefício melhor. A terbinafina tem demonstrado ser mais eficaz e também estar associada a uma menor de recorrência do que o itraconazol para onicomicose causadas por dermatófitos (VAN DUYN GRAHAM; ELEWSKI, 2011; YIN *et al.*, 2012; GUPTA *et al.*, 2013b). Contudo, não se tem relatos sobre seu uso combinado na clínica nem na formulação de formas farmacêuticas.

NOVOS ANTIFÚNGICOS DE ORIGEM NATURAL

Perante a toxicidade de alguns fármacos antifúngicos e a emergente resistência a muitos deles, outra estratégia é a pesquisa de extratos e frações purificadas, assim como de substâncias bioativas isoladas de plantas, principalmente. Alguns exemplos são destacados na sequência.

Os estudos sobre as atividades antifúngicas contra dermatófitos de dez plantas da ilha de Guadalupe revelaram resultados que sugerem que os extratos de *Bursera simaruba*, *Cedrela odorata*, *Enterolobium cyclocarpum* e *Pluchea carolinensis* tem uma atividades promissora e poderiam ser bons candidatos para o desenvolvimento de formulações antifúngicas (BIABIANY *et al.*, 2013)

O estudo do fracionamento biomonitorado, dos constituintes das raízes *Hypericum perforatum subsp. angustifolium* demonstraram que a fração de xantona apresentou uma maior atividade antifúngicas contra *C. neoformans* e dermatófitos, com valores de CIM aproximados de 20 µg/mL. Os autores concluíram que a

associação de extratos das raízes e O-carboximetilchitosana pode ser um tópico promissor para futuros estudos farmacológicos e clínicos (TOCCI *et al.*, 2013).

SAPONINAS

Quimicamente, as saponinas consistem em um núcleo esteroide ou triterpênico (sapogenina), de caráter hidrofóbico, ao qual se encontram ligadas cadeias osídicas, hidrofílicas, originando estruturas anfipáticas ou anfifílicas. Dependendo do número e natureza das cadeias de açúcares ligados à sapogenina, as saponinas são classificadas em monodesmosídicas (uma cadeia) e bidesmosídicas (duas cadeias).

Uma das características frequentemente associadas às saponinas é a sua capacidade de complexar esteróis presentes na membrana de células eucarióticas - o que inclui fungos- causando formação de poros e perda da integridade da membrana, (KEUKENS *et al.*, 1995; ARMAH *et al.*, 1999). No entanto, nem todas as saponinas apresentam atividade antifúngica, uma vez que esta depende da sua estrutura química. Essa atividade é mais acentuada em saponinas monodesmosídicas com quatro ou cinco monossacarídeos (HOSTETTMANN; MARSTON, 1995).

Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) é sistematicamente cultivada no Peru, Bolívia e Equador. A casca exterior do grão contém um elevado teor de saponinas bidesmosídicas (20 a 30%), conferindo-lhe forte sabor amargo e obrigando a retirada dessa casca antes do consumo como alimento.

As saponinas de quinoa apresentam quatro núcleos triterpênicos predominantes (ácido oleanólico, hederagenina, ácido fitolacagênico e ácido serjánico) tendo sido identificadas ou apenas detectadas 70 estruturas isoladas, podendo ser monodesmosídicas ou bidesmosídicas. (WOLDEMICHAEL; WINK, 2001; ZHU *et al.*, 2002; MADL *et al.*, 2006).

Ainda que escassos, há relatos sobre a atividade das saponinas de quinoa contra fitopatógenos agrícolas. Assim, a atividade de saponinas de quinoa hidrolisadas em

meio alcalino contra o fitopatógeno *Botrytis cinerea* merece destaque. Ao contrário do preconizado por outros autores (ANISIMOV; CIRVA, 1980), foram as agliconas e as saponinas mais hidrofóbicas e menos solúveis as que mostraram maior atividade, inibindo o crescimento de hifas e a produção de esporos. Experimentos que avaliaram a integridade de membrana de fungos mostraram que após tratamento alcalino das saponinas, estas podem gerar ruptura da membrana, enquanto que as saponinas não tratadas, não apresentaram estes efeitos (SAN MARTÍN *et al.*, 2008; STUARDO; SAN MARTÍN, 2008).

Ainda, existem poucos relatos de atividade antifúngica para saponinas contra fungos patogênicos a humanos, Segundo Woldemichael ; Wink (2001), uma fração de saponinas totais de *C. quinoa* foi capaz de inibir o crescimento de *Candida albicans*. Entretanto, somente a mistura de saponinas totais apresentou atividade (CIM de 50 µg/mL.), enquanto que as saponinas isoladas mostraram pouca ou nenhuma atividade, o que sugere um possível efeito sinérgico entre essas saponinas (SPARG *et al.*, 2004).

CAPÍTULO 1. Avaliação da atividade antifúngica de frações
de saponinas de *Chenopodium quinoa Willd*

1. INTRODUÇÃO

Chenopodium quinoa (quinua ou quinoa) é uma espécie de ocorrência nos Andes. Particularmente, suas sementes são ricas em proteínas e, também, em saponinas. Essas últimas se acumulam nas cascas dos grãos, conferindo-lhes baixa palatabilidade e isso obriga a sua remoção antes do consumo (WOLDEMICHAEL; WINK, 2001; MADL *et al.*, 2006; KULJANABHAGAVAD *et al.*, 2008). Uma das características das saponinas de quinoa é a diversidade de núcleos triterpênicos presentes, entre outros, derivados dos ácidos oleanólico, fitolacagênico, serjânico e da hederagenina (VERZA, 2011).

A atividade antifúngica tem sido relatada para diversas saponinas (VERZA, 2011). Entretanto, no caso específico das saponinas de quinoa há poucos estudos tratando deste tema. Estudos anteriores relatam atividade significativa contra *Candida albicans*, fungo patógeno que acomete seres humanos, e *Botrytis cinerea*, fitopatógeno de parreirais (WOLDEMICHAEL; WINK, 2001; STUARDO; SAN MARTÍN, 2008).

Neste contexto, o presente capítulo aborda a avaliação da associação da fração de saponinas de quinoa com griseofulvina e terbinafina, dois antifúngicos comerciais amplamente utilizados para o tratamento de dermatofitoses.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ASPECTOS BOTÂNICOS

Chenopodium quinoa Willd (*Chenopodiaceae*) é uma espécie granífera originária da América do Sul, cultivada pelos povos habitantes da Cordilheira dos Andes há milhares de anos desde o nível do mar até uma altitude de 3800 m, podendo crescer em diferentes tipos de solos, com ciclo variando de 80 a 150 dias nas condições do Brasil Central. Seus frutos são do tipo aquênio, pequenos, de forma cilíndrica, achatada de tamanho que varia de 2 a 2,5 mm de diâmetro e 1,2 a 1,6 mm de largura e sem dormência, por isso é considerado um pseudocereal (BRADY *et al.*, 2007; YAWADIO *et al.*, 2008).

2.2 ASPECTOS FITOQUÍMICOS

A importância alimentícia das sementes de quinoa quanto à sua composição em proteínas, gordura, fibras, aminoácidos e minerais está bem fundamentada na literatura (COMAI *et al.*, 2007; YAWADIO *et al.*, 2008). Contudo, no que diz respeito ao presente trabalho, a fração bioativa de interesse é a das saponinas, cuja remoção das sementes faz parte do beneficiamento do grão visando sua maior palatabilidade como alimento (COMAI *et al.*, 2007).

As saponinas de quinoa são substâncias anfifílicas e incluem mais de 70 estruturas isoladas, com massas moleculares relativamente altas. Ocorrem na forma de triterpenos monodesmosídicos e bidesmosídicos, em que a porção hidrofílica consiste em uma ou mais cadeias de açúcares ligadas a uma aglicona hidrofóbica. As principais agliconas encontradas em quinoa incluem: hederagenina e os ácidos oleanólico, fitolacagênico e serjânico. As cadeias de açúcares estão normalmente ligadas às posições C-3 (monodesmosídicas) ou C-3 e C-28 do núcleo triterpênico (bidesmosídicas) (WOLDEMICHAEL; WINK, 2001; MICHAEL, 2007; KULJANABHAGAVAD; WINK, 2009.)

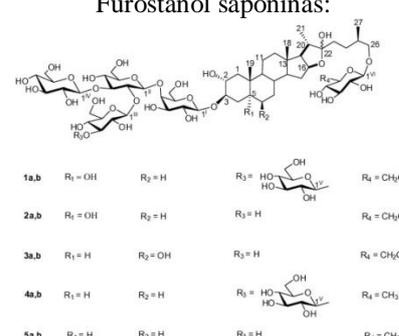
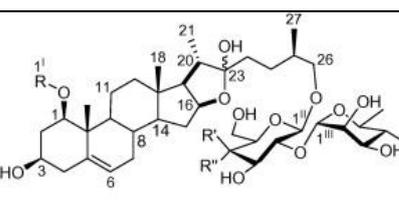
Métodos de extração e de purificação de saponinas de quinoa foram desenvolvidos anteriormente em trabalho de tese (VERZA, 2011). A composição

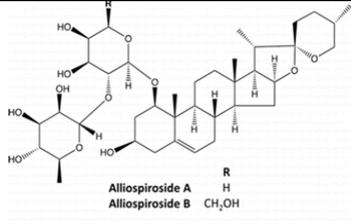
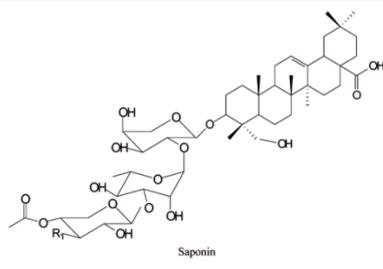
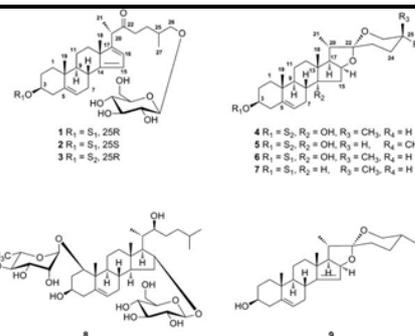
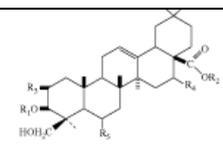
química das denominadas frações de saponinas FQ70 e FQ90 foi analisada por técnicas de CLAE-PDA e UPLC/Q-TOF-MS. Observou-se um predomínio de saponinas derivadas do ácido oleanólico e da hederagenina na fração FQ90, que não foram detectadas em FQ70 em quantidades mensuráveis. Essa diferença na composição química das duas frações foi relevante para entendimento das propriedades químicas e físicas de cada uma.

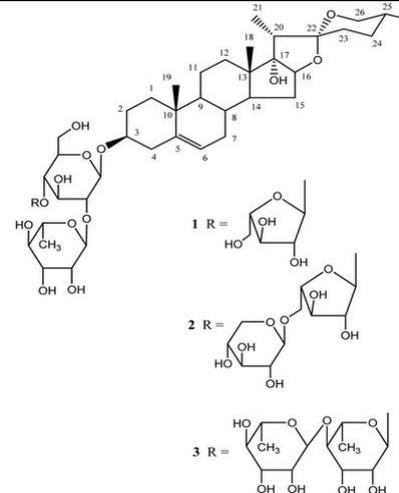
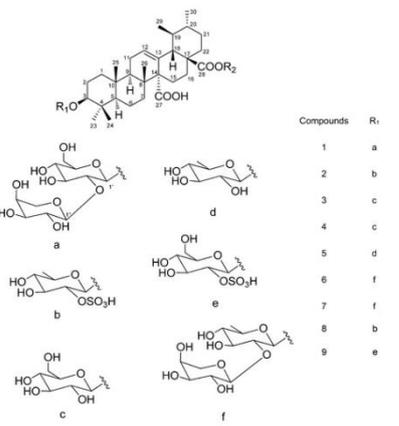
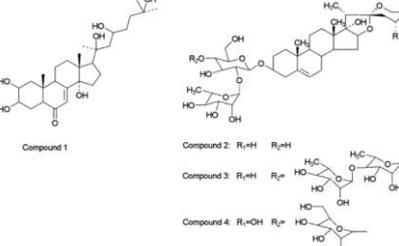
2.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS ATRIBUÍDAS A SAPONINAS

Para as saponinas de diversas espécies tem sido relatada atividade antifúngica, quer seja para leveduras ou fungos filamentosos, incluindo fitopatógenos e fungos patogênicos ao ser humano e mamíferos (Tabela 1).

Tabela 1. Exemplos de saponinas com atividade antifúngica relatada.

Nome comum	Nome científico	Composto	Espécie(s) alvo(s)	Referência
Alho	<i>Allium sativum</i> <i>L. var.</i> <i>Voghiera.</i>	<p>Furostanol saponinas:</p>  <p>1a,b R₁ = OH R₂ = H R₃ = OH R₄ = CH₂OH 2a,b R₁ = OH R₂ = H R₃ = H R₄ = CH₂OH 3a,b R₁ = H R₂ = OH R₃ = H R₄ = CH₂OH 4a,b R₁ = H R₂ = H R₃ = OH R₄ = CH₃ 5a,b R₁ = H R₂ = H R₃ = H R₄ = CH₃</p>	<i>B. cinérea</i> <i>T. harzianum</i>	(LANZOTTI <i>et al.</i> , 2012a)
Cebola	<i>Allium cepa</i> L.	 <p>Cepeptide A (1) R = β-D-Xyl R' = OH R'' = H Cepeptide B (2) R = β-D-Xyl R' = H R'' = OH Cepeptide C (3) R = β-D-Gal R' = OH R'' = H</p>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> , <i>R. solani</i> <i>Sclerotium cepivorum</i> <i>Alternaria alternata</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>Mucor</i> sp., <i>Phomopsis</i> sp <i>T. atroviride</i> <i>Trichoderma harzianum</i>	(LANZOTTI, <i>et al.</i> , 2012b)

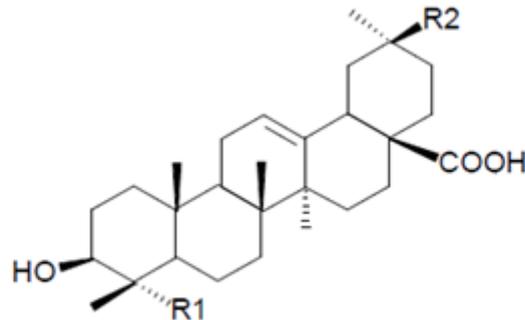
Nome comum	Nome científico	Composto	Espécie(s) alvo(s)	Referência																																				
Cebola	<i>Allium cepa L. grupo Aggregatum</i>	 <p>Alliospiroside A Alliospiroside B</p> <p>R H CH₂OH</p>	Fitopatógenos	(TESHIMA <i>et al.</i> , 2013)																																				
Ervilha-de-cheiro	<i>Lathyrus ratan e Lathyrus aphaca.</i>	<p>3-O-[[β-D-glucuronopiranosilo-(1 → 4)-α-L-arabinopiranosil-(1 → 2)-α-L-arabinopiranosil]-olean-11, 13 (18) -dien-28- olico</p> <p>ácido 3-O-{β-D-xilopiranosil-(1 → 2)-β-D-glcopiranosyl-(1 → 4) - [β-D-glucopiranosil-(1 → 2)]-β-D-xilopiranosil} -2,16 α-diidroxi-4-hidroximetil-en-28-olico</p>	<i>Colletotrichum dematium</i> <i>Alternaria alternata</i>	(KHAN, 2011)																																				
Fruta de sabão	<i>Sapindus saponaria L.</i>	 <p>Saponin</p> <p>Saponin 1 R₁ = OH Saponin 2 R₁ = OAc</p> <p>Fig. 1</p>	<i>Candida albicans</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Candida parapsilosis</i>	(TSUZUKI <i>et al.</i> , 2007)																																				
Sêlo-de-Salomão	<i>Polygonatum odoratum (Liliaceae)</i>	 <p>1 R₁ = S₁, 2SR 2 R₁ = S₁, 2SS 3 R₁ = S₂, 2SR</p> <p>4 R₁ = S₂, R₂ = OH, R₃ = CH₃, R₄ = H 5 R₁ = S₂, R₂ = OH, R₃ = H, R₄ = CH₃ 6 R₁ = S₁, R₂ = OH, R₃ = CH₃, R₄ = H 7 R₁ = S₁, R₂ = H, R₃ = CH₃, R₄ = H</p> <p>8 9</p>	<i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus fumigatus</i>	(BAI <i>et al.</i> , 2013)																																				
Sabão da Índia	<i>Sapindus mukorossi Gaertn.</i> <i>Diploknema butyracea JF Gmelin</i>	 <table border="1" data-bbox="622 1792 1069 1948"> <thead> <tr> <th>Compound</th> <th>R₁</th> <th>R₂</th> <th>R₃</th> <th>R₄</th> <th>R₅</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>MI-I</td> <td>Glu-Glu</td> <td>Ara-Xyl-Ara</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td>MI-III</td> <td>Glu-Glu-Glu</td> <td>Ara-Xyl-Ara-Agl</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td>SM-I</td> <td>Xyl(OAc)-Ara-Rha</td> <td>Glu-Glu-Rha</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>16-Hydroxyprotocassic acid</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td>Heterogentin</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>H</td> </tr> </tbody> </table>	Compound	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	MI-I	Glu-Glu	Ara-Xyl-Ara	OH	OH	OH	MI-III	Glu-Glu-Glu	Ara-Xyl-Ara-Agl	OH	OH	OH	SM-I	Xyl(OAc)-Ara-Rha	Glu-Glu-Rha	H	H	H	16-Hydroxyprotocassic acid	H	H	OH	OH	OH	Heterogentin	H	H	H	H	H	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Rhizoctonia bataticola</i> , <i>Sclerotium rolfsii Sacc.</i> <i>Fusarium udum</i>	(SAHA <i>et al.</i> , 2010)
Compound	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅																																			
MI-I	Glu-Glu	Ara-Xyl-Ara	OH	OH	OH																																			
MI-III	Glu-Glu-Glu	Ara-Xyl-Ara-Agl	OH	OH	OH																																			
SM-I	Xyl(OAc)-Ara-Rha	Glu-Glu-Rha	H	H	H																																			
16-Hydroxyprotocassic acid	H	H	OH	OH	OH																																			
Heterogentin	H	H	H	H	H																																			

Nome comum	Nome científico	Composto	Espécie(s) alvo(s)	Referência																														
---	<i>Paris polyphylla</i> Smith	 <p>Fig. 1. Chemical structures of the isolated saponins 1, 2, and 3.</p>	<i>C. cladosporioides</i> <i>C. albicans</i>	(DENG <i>et al.</i> , 2008)																														
---	<i>Zygothellium coccineum</i>	 <table border="1"> <thead> <tr> <th>Compounds</th> <th>R₁</th> <th>R₂</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>a</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>b</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>c</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>c</td> <td>c</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>d</td> <td>c</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>f</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>f</td> <td>c</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>b</td> <td>c</td> </tr> <tr> <td>9</td> <td>e</td> <td>H</td> </tr> </tbody> </table>	Compounds	R ₁	R ₂	1	a	H	2	b	H	3	c	H	4	c	c	5	d	c	6	f	H	7	f	c	8	b	c	9	e	H	<i>Colletotrichum acutatum</i> , <i>C. fragariae</i> , <i>C. gloeosporioides</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Phomopsis obscurans</i> , <i>P. viticola</i> , <i>Fusarium oxysporum</i>	(AMIN <i>et al.</i> , 2011)
Compounds	R ₁	R ₂																																
1	a	H																																
2	b	H																																
3	c	H																																
4	c	c																																
5	d	c																																
6	f	H																																
7	f	c																																
8	b	c																																
9	e	H																																
---	<i>Paris polyphylla</i> Smith var. <i>yunnanensis</i>	 <p>Compound 1</p> <p>Compound 2: R₁=H R₂=H</p> <p>Compound 3: R₁=H R₂=H</p> <p>Compound 4: R₁=OH R₂=H</p>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(ZHU <i>et al.</i> , 2011)																														

Nota: as estruturas químicas foram reproduzidas das fontes bibliográficas respectivas (última coluna)

Sobre a atividade antifúngica relacionada à quinoa, estudos realizados por Stuardo e San Martín (2008) revelaram que a atividade inibitória das saponinas sobre fitopatôgenos fúngicos é geralmente menor do que a observada em agliconas isoladas. Autores postulam que a atividade é altamente influenciada pelo grupo funcional ligado

ao esqueleto da aglicona. Uma cadeia osídica ligada em C-3 é geralmente crítica, tanto para a permeabilidade da membrana quanto para as propriedades antifúngicas.



	R1	R2
Ácido oleanólico	CH ₃	CH ₃
Hederagenina	CH ₂ OH	CH ₃
Ácido fitolacagênico	CH ₂ OH	COOCH ₃
Ácido serjânico	CH ₃	COOCH ₃

Figura 7. Estrutura geral das principais sapogeninas relatadas para *C. quinoa*.

Para a fração purificada de saponinas de quinoa tem sido relatada atividade antifúngica contra *Candida albicans*, com inibição de crescimento na concentração de 50 µg/mL. A avaliação das saponinas individuais mostrou pouca ou nenhuma atividade antifúngica, o que sugere um possível efeito sinérgico entre as saponinas (WOLDEMICHAEL; WINK, 2001).

A avaliação pelo método de difusão em ágar da atividade antifúngica de duas frações saponosídicas (FQ70 e FQ90) sobre isolados clínicos de leveduras e fungos filamentosos revelou serem inativas frente a leveduras (VERZA , 2011). Esta constatação se opõe a resultados anteriormente descritos na literatura (WOLDEMICHAEL; WINK, 2001). Por outro lado, as frações demonstraram

atividade contra os dermatófitos, e tanto FQ90 quanto FQ70 inibiram *M. gypseum* e *M. canis*. A concentração inibitória mínima (CIM) da FQ90 foi 62 e 125 µg/mL para *M. gypseum* e *M. canis*., respectivamente; a CIM da FQ70 foi 125 µg/mL em ambos os casos. Essas diferenças de perfis micológicos podem estar relacionadas com a composição química das frações, onde a FQ70 apresentou teor superior de derivados fitolacagênicos, e FQ90 apresentou maior concentração dos derivados do ácido oleanólico e hederagenina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Solventes, reagentes e meio de cultura

Acetonitrila grau CLAE (Tedia); ácido perclórico (Synth); álcool etílico (Nuclear); Álcool metílico (Nuclear); Resina adsorvente polimérica Diaion HP 20 (Supelco, Estados Unidos); Agar batata dextrose (ABD) (Pronadisa, Madrid, Spain); Meio RPMI 1640 contendo L-glutamina, sem bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich Co., St Louis, EUA); Tampão ácido propanosulfônico 3-[N-morfolino] (MPOS) (Sigma Aldrich Co., St Louis, EUA).

3.1.2 Equipamentos

Agitador magnético Fisatom 725 A; balança analítica semi-micro (AND, Estados Unidos); banho de ultra-som com aquecimento (UNIQUE, Brasil); banho de água Biomatic modelo 869; coluna cromatográfica Phenomenex Gemini NX RP C18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm particle size); coluna de vidro sinterizado (600 x 10 mm d.i); evaporador rotatório R-144 (Büchi, Suíça); liofilizador Modulyo® 4k (Edwards, Inglaterra); sistema de CLAE Shimadzu LC-20 AT (Kyoto, Japan) composto por bomba de alta pressão duplo pistão LC-20 AD, amostrador automático SIL-20A, detector espectrofotométrico por arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A e software de gerenciamento de dados LC-Solution Multi-DAD.

3.1.3 Material vegetal e fármacos

As sementes de *Chenopodium quinoa* de plantas cultivadas na região de Cochabamba (Bolívia) foram gentilmente cedidas pela Profa. Dr. Simone Verza.

Amostras de griseofulvina e terbinafina foram adquiridas foi adquirida de Deg Importações de produtos químicos (São Paulo, Lote 20100523) e Pharmagel (Cachoerinha, Rio Grande do Sul, Lote 285334), respectivamente.

3.1.4 Micro-organismos

Os 42 isolados clínicos selecionados para os ensaios microbiológicos foram obtidos da micoteca do Laboratório de Micologia de Prof. Alexandre Fuentefria, da Faculdade de Farmácia, UFRGS. As cepas foram conservadas em tubos com tampa contendo ágar Sabouraud Dextrose inclinado, em temperatura ambiente.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Obtenção da solução extrativa de quinoa

A solução extrativa das sementes de quinoa foi obtida por decocção a 50 °C, sob refluxo de 60 min e agitação constante, utilizando solução hidroetanólica a 40% (v/v) e uma proporção planta: solvente de 1:10. A solução foi filtrada por papel filtro Whatmann nº 2, aplicando vácuo moderado. O filtrado foi concentrado a 2/3 do volume original em evaporador rotatório, a 55 ± 3 °C. A solução concentrada foi congelada a -4 °C, liofilizado (aparelho, modelo, país) (VERZA, 2011).

3.2.2 Obtenção da fração enriquecida em saponinas

Foi utilizado o método desenvolvido anteriormente (VERZA, 2011). Uma amostra de 700 mg de solução extrativa de quinoa foi fracionada utilizando resina hidrofóbica Diaion HP-20, etanol e água como eluentes, em gradiente de polaridade decrescente (30, 50, 70 e 90%, m/m). As frações correspondentes aos eluatos obtidos com misturas hidroetanólicas a 70 e 90% foram reunidas, filtradas por papel-filtro e concentradas sob pressão reduzida em rotavapor, até a metade do volume original. O concentrado obtido foi liofilizado na sequência.

3.2.3 Caracterização e doseamento dos extratos e frações bioativas por CLAE

A caracterização e o doseamento das saponinas presentes nos extratos e frações obtidas foram realizados utilizando o método por CLAE, previamente desenvolvido e validado (VERZA, 2011).

3.2.4 Avaliação da atividade antifúngica por teste de suscetibilidade

3.2.4.1 *Preparação do inóculo fúngico*

O método de microdiluição em placa teve por base as diretrizes do Clinical Laboratory Standart Institute (CLSI, 2002, Norma M38-A2), com alterações. Os isolados foram cultivados em ágar-batata-dextrose e incubados em estufa a 32 °C durante 7 a 15 dias. Após incubação, as colônias foram cobertas com aproximadamente 4 mL de salina estéril (0,85%) e raspadas cuidadosamente com o auxílio da uma alça. Esta suspensão, contendo conídios e fragmentos de hifas, foi aspirada com pipeta de Pasteur e transferida para um tubo estéril. As estruturas fúngicas mais pesadas foram descartadas após repouso de 15 a 20 min e a parte superior da suspensão foi transferida para um novo tubo estéril e homogeneizada com auxílio de vórtex. As leituras foram realizadas em 530 nm (Diode array spectrophotometer, HP), ajustando as concentrações com solução salina estéril de modo a obter leituras de transmitância entre 80 e 85% para cada isolado testado. A partir desta suspensão, foi preparada uma diluição de 1:100 em RPMI-MOPS (meio RPMI 1640 contendo L-glutamina, sem bicarbonato de sódio – Sigma-Aldrich Co., St Louis, EUA – tamponado com 0,165 mol/L de tampão MPOS – Sigma) com o objetivo de obter uma concentração final de $0,4 \cdot 10^4$ a $5 \cdot 10^4$ células/mL.

3.2.4.2 *Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)*

A concentração inibitória mínima foi determinada pelo método da microdiluição em placa, de acordo com as diretrizes do Clinical and Laboratory Standar Institute (CLSI, 2002 doc., M38-A2), com modificações.

Para o ensaio foram utilizadas placas de microdiluição contendo 96 poços, com fundo em forma de “U”, com tampa (ALAMAR®, Diadema, São Paulo, Brasil). A FQ70 foi dissolvida em água enquanto que a FQ90 foi diluída em 10% dimetilsulfóxido (DMSO), devido sua baixa solubilidade em água. As soluções das frações foram diluídas para obter concentrações na faixa de 500 a 1,95 µg/mL. Paralelamente foi realizado um controle dos diluentes utilizados no ensaio. Uma alíquota de 200 µL da fração de maior concentração foi adicionada na 1ª fileira da microplaca, procedendo-se a uma diluição geométrica transferindo 100 µL da 1ª fileira

para a 2^a; da 2^a para a 3^a, e assim por diante, até a 10^a fileira. A cada uma dessas diluições foi acrescentado 100 µL do inóculo previamente preparado em RPMI. Foi incluído no ensaio um controle positivo (somente o inóculo e meio, sem a fração) e um controle negativo (somente o meio de cultura). Terbinafina e griseofulvina foram utilizados como controle positivo de inibição, variando as concentrações de 0,25 a 32 µg/mL, segundo o caso.

As microplacas foram incubadas a 32 °C, durante 7 dias. A determinação da CIM das frações foi feita pelo método visual, tendo por critério a formação ou não de aglomerados de células (“botão”) no fundo da cavidade da placa. Dessa forma, foi considerado como CIM, a menor concentração do produto em teste capaz de produzir inibição visível sobre o crescimento das cepas testadas no ensaio. Cada isolado foi testado em triplicata.

3.2.4.3 Ensaio de Sinergismo - Método de checkerboard

Foram dispensadas nas cavidades da microplaca alíquotas de 50 µL das frações FQ90 e FQ70 e os antifúngicos comerciais, em diversas concentrações (CIM/8, CIM/4, CIM/2, CIM, CIMx2, CIMx4, CIMx8): no sentido vertical da microplaca foi depositado o volume com as concentrações requeridas dos fármacos e no sentido horizontal deposita-se o volume com as concentrações das frações em estudo. Uma alíquota de 100 µL do inóculo foi adicionada a cada cavidade, de modo a resultar em um volume final de 200 µL. As microplacas foram incubadas a 35 °C por 48 h. A CIM foi determinada por leitura visual. A análise da interação entre os antifúngicos foi determinada através dos índices das concentrações inibitórias fracionadas (ICIF). Esse índice foi calculado pela soma das concentrações inibitórias fracionadas (CIF), onde $CIF^A = (CIM \text{ do Antifúngico A em combinação com Antifúngico B}) / (CIM \text{ Antifúngico A sozinho})$; e $CIF^B = (CIM \text{ do Antifúngico B em combinação com Antifúngico A}) / (CIM \text{ Antifúngico B sozinho})$. Portanto: $ICIF = CIF^A + CIF^B$ (KONTOYIANNIS ; LEWIS, 2003).

Os resultados serão interpretados conforme o valor do ICIF em sinérgicos ($ICIF \leq 0,5$), aditivos ($0,5 < FICI < 1$), indiferentes ($1 \leq FICI < 4$) ou antagonistas ($FICI \geq 4$) (WHITE *et al.*, 1996; LEWIS *et al.*, 2002).

4. RESULTADOS

Ainda que parcialmente diferentes as composições químicas, no presente trabalho optou-se por utilizá-las separadamente, considerando o carácter exploratório dos testes.

As frações de saponinas de quinoa (FQ70 e FQ90) foram inicialmente testadas contra quatro isolados de cada espécie dos dermatófitos, selecionados aleatoriamente e apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Isolados clínicos utilizados para o ensaio de suscetibilidade frente as frações de quinoa

<i>M. canis</i>	<i>M. gypseum</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. rubrum</i>
MCA 29	MGY 42	TME 16	TRU 20
MCA 39	MGY 45	TME 31	TRU 25
MCA 36	MGY 53	TME 34	TRU 46
MCA 40	MGY 58	TME 46	TRU 48

A FQ70 demonstrou ser inativa frente aos isolados de dermatófitos testados e a FQ90 demonstrou-se ativa. Entretanto a indução de resultados pseudo-positivos foi detectada no controle do solvente da FQ90, corroborando um estudo anterior no qual esta possibilidade foi levantada (HAZEN, 2013). A inibição das células foi constatada até a concentração de 2,5% de DMSO e, portanto, foram utilizadas concentrações inferiores a esta para os testes posteriores de atividade antifúngica. Uma solução estoque de 50 mg/mL de FQ90 foi preparada em 100% de DMSO, e diluições foram realizadas para a obtenção de 500 µg/mL de FQ90 com concentração máxima de 1% de DMSO. Nessas condições não foi possível evidenciar qualquer atividade inibitória significativa para as frações de saponinas.

No estudo da avaliação da atividade sinérgica das frações purificadas de saponinas de quinoa com os antifúngicos (TF ou GF), foi observada a atividade da associação (FQ 70-GF, FQ70-TF, FQ90-GF e FQ90-TF), e todos os isolados testados demonstraram atividade classificada como indiferente. Os IFICs foram calculados e estão representados na tabela 3, entretanto em todos os casos os valores foram

superiores a 1. Contudo é importante destacar que a atividade antifúngica da associação foi sempre indiferente, mesmos contra isolado sensível aos dois antifúngicos, resistentes a GF ou multirresistente.

Tabela 3. Atividade sinérgica da associação de TF ou GF com as frações FQ70 e FQ90 testada espécies de dermatófitos selecionadas

Espécie	Isolados	Ativ.	CIM ($\mu\text{g/mL}$)				ICIF das combinações			
			GF	TF	FQ70	FQ90	FQ 70 /GF	FQ70 /TF	FQ90 /GF	FQ90 /TF
<i>M. canis</i>	MCA 39	S	0,25	0,03	>500,0	>500,0	1,03	1,03	1,06	1,03
	MCA 36	R GF	>32,0	1,0	>500,0	>500,0	1,12	1,12	1,12	1,12
<i>M. gypseum</i>	MGY 42	S	1,0	0,03	>500,0	>500,0	1,06	1,03	1,03	1,03
	MGY 58	R GF	>32,0	2,0	>500,0	>500,0	1,12	1,12	1,12	1,12
<i>T. mentagrophytes</i>	TME 16	R	>32,0	4,0	>500,0	>500,0	1,50	1,50	1,50	1,50
	TME 46	S	0,5	0,125	>500,0	>500,0	1,03	1,06	1,03	1,06
<i>T. rubrum</i>	TRU 25	R GF	>32,0	1,0	>500,0	>500,0	1,12	1,12	1,12	1,12
	TRU 46	S	2,0	0,03	>500,0	>500,0	1,03	1,03	1,06	1,03

Observação: GF griseofulvina, TF terbinafina, FQ frações purificadas de quinoa, CIM concentração inibitória mínima, ICIF índices das concentrações inibitórias fracionadas, S isolado sensível a GF e TF; R GF isolado resistente a GF; R isolado resistente a TF e GF.

5. DISCUSSÃO

A diversidade estrutural das saponinas, que são compostas de unidades osídicas ligadas a um esqueleto de aglicona hidrofóbica, Essa estrutura molecular confere as saponinas à capacidade de formar poros em bicamadas lipídicas, aumentando a permeabilidade celular levando a desestabilidade osmótica (SIMONS *et al.*, 2006). Devido a esta capacidade e relatos de atividades antifúngicas, esperava-se, encontrar atividade antidermatofítica para as saponinas de quinoa. Porém, contrariando estudos anteriores (WOLDEMICHAEL; WINK, 2001), as frações de saponinas não apresentaram efeito inibitório sobre os dermatófitos.

De acordo com os resultados anteriores obtidos por meio de análises CLAE e UPLC/Q-TOF-MS (VERZA, 2011), frações FQ70 e FQ90 apresentam perfis cromatográficos semelhantes, porem FQ90 exhibe saponinas adicionais, que são os derivados do ácido oleanólico e a hederagenina. Entretanto, nenhuma das frações apresentou atividade antifúngica, embora ambas mostrem diferenças na sua constituição, bem como na proporção dos constituintes majoritários. Com isso, cabe supor que a atividade antifúngica relatada para extratos não esteja ligada aos derivados da hederagenina, do ácido fitolacagênico, ácido serjânico e do ácido oleanólico - componentes majoritários das frações de saponinas da quinoa.

Nesse mesmo contexto, Verza (2011) constatou que as duas frações da quinoa apresentam estruturas micelares distintas, quando em concentrações acima da concentração micelar crítica. A fração FQ70 apresenta micelas esféricas, enquanto que FQ90 apresenta micelas tubulares. Devido a essa característica de formação de micelas, presumia-se que as saponinas fossem capazes de produzir essas estruturas e assim promover a atividade antifúngica quando associadas com TF ou GF. Além disso, esperava-se que essas micelas seriam capazes de proteger o fármaco dos mecanismos de resistência dos fungos ajudando assim o fármaco a ter seu efeito. Contrariando as nossas expectativas, a combinação das frações de saponinas FQ70 e FQ90 em nada alterou a atividade da TF ou GF, tanto em isolados resistentes como em sensíveis esses antifúngicos.

6. CONCLUSÃO

- ✓ As frações saponosídicas F70 e F90 *C. quinoa* não apresentaram atividade antifúngica para as espécies de dermatófitos testadas. É importante destacar que as saponinas apresentam um grupo bastante heterogêneo de estrutura e, desta forma, as atividades biológicas podem variar.
- ✓ Apesar das frações de quinoa, FQ70 e FQ90 originarem estruturas micelares distintas, nenhuma dessas estruturas foi capaz de potencializar a atividade antifúngica da griseofulvina nem da terbinafina. Esse estudo demonstrou que a associação dessas saponinas com os antifúngicos testados não possibilitaria qualquer potencial tratamento de micoses cutâneas relacionadas à dermatófitos.

7. REFERENCIAS

AMIN, E.; EL-HAWARY, S. S.; FATHY, M. M.; MOHAMMED, R.; ALI, Z.; TABANCA, N.; WEDGE, D. E.; BECNEL, J. J.; KHAN, I. A. Triterpenoidal saponins: bioactive secondary metabolites from *Zygophyllum coccineum*. **Planta Medica**, v. 77, n. 5, p. 488-91, 2011.

BAI, H.; LI, W.; ZHAO, H.; ANZAI, Y.; LI, H.; GUO, H.; KATO, F.; KOIKE, K. Isolation and structural elucidation of novel cholestane glycosides and spirostane saponins from *Polygonatum odoratum*. **Steroids**, v. 80, p. 7-14, 2013.

BRADY, K.; HO, C.-T.; ROSEN, R. T.; SANG, S.; KARWE, M. V. Effects of processing on the nutraceutical profile of quinoa. **Food Chemistry**, v. 100, n. 3, p. 1209-16, 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous fungi; Approved Standard – second Edition. CLSI Document M38-A2. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2002.

COLEMAN, J. J.; OKOLI, I.; TEGOS, G. P.; HOLSON, E. B.; WAGNER, F. F.; HAMBLIN, M. R.; MYLONAKIS, E. Characterization of plant-derived saponin natural products against *Candida albicans*. **ACS Chemical Biology**, v. 5, n. 3, p. 321-32, 2010.

COMAI, S.; BERTAZZO, A.; BAILONI, L.; ZANCATO, M.; COSTA, C. V. L.; ALLEGRI, G. The content of proteic and nonproteic (free and protein-bound) tryptophan in quinoa and cereal flours. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1350-5, 2007.

DENG, D.; LAUREN, D. R.; COONEY, J. M.; JENSEN, D. J.; WURMS, K. V.; UPRITCHARD, J. E.; CANNON, R. D.; WANG, M. Z.; LI, M. Z. Antifungal saponins from *Paris polyphylla* Smith **Planta Medica**, v. 74, n. 11, p. 1397-402, 2008.

HAZEN, K. C. Influence of DMSO on antifungal activity during susceptibility testing in vitro. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 75, p. 60–63, 2013.

HERLT, A. J.; MANDER, L. N.; PONGO, E.; RUMAMPUK, R. J.; TARIGAN, P. Two major saponins from seeds of *Barringtonia asiatica*: putative antifeedants toward *Epilachna* sp. larvae. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 2, p. 115-20, 2002.

KHAN, N. A. Two antifungal active triterpenoid saponins from the seeds of *Lathyrus* plants. **Natural Product Research**, v. 25, n. 18, p. 1687-94, 2011.

KONTOYIANNIS, D. P.; LEWIS, R. E. Combination chemotherapy for invasive fungal infections: what laboratory and clinical studies tell us so far. **Drug Resistance Updates**, v. 6, n. 5, p. 257-69, 2003.

KULJANABHAGAVAD, T.; THONGPHASUK, P.; CHAMULITRAT, W.; WINK, M. Triterpene saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. **Phytochemistry**, v. 69, n. 9, p. 1919-26, 2008.

LANZOTTI, V.; BARILE, E.; ANTIGNANI, V.; BONANOMI, G.; SCALA, F. Antifungal saponins from bulbs of garlic, *Allium sativum* L. var. *Voghiera*. **Phytochemistry**, v. 78, p. 126-34, 2012a.

LANZOTTI, V.; ROMANO, A.; LANZUISE, S.; BONANOMI, G.; SCALA, F. Antifungal saponins from bulbs of white onion, *Allium cepa* L. **Phytochemistry**, v. 74, p. 133-9, 2012.

LEWIS, R. E.; DIEKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A.; KLEPSE, M. E. Comparison of Etest, checkerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 345-51, 2002.

SAHA, S.; WALIA, S.; KUMAR, J.; PARMAR, B. S. Structure-biological activity relationships in triterpenic saponins: the relative activity of protobassic acid and its derivatives against plant pathogenic fungi. **Pest Management Science**, v. 66, n. 8, p. 825-31, 2010.

SIMONS, V.; MORRISSEY, J. P.; LATIJNHOUWERS, M.; CSUKAI, M.; CLEAVER, A.; YARROW, C.; OSBOURN, A. Dual effects of plant steroidal alkaloids on *Saccharomyces cerevisiae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 8, p. 2732-40, 2006.

SPEHAR, C. R.; SOUZA, P. I. M. Adaptação da quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) ao cultivo nos cerrados do Planalto Central: resultados preliminares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 28, n. 5, p. 635-9, 1993.

STUARDO, M.; SAN MARTÍN, R. Antifungal properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) alkali treated saponins against *Botrytis cinerea*. **Industrial Crops and Products**, v. 27, n. 3, p. 296-302, 2008.

TESHIMA, Y.; IKEDA, T.; IMADA, K.; SASAKI, K.; EL-SAYED, M. A.; SHIGYO, M. TANAKA, S.; SHIN-ICHI, I. Identification and biological activity of antifungal

saponins from shallot (*Allium cepa* L. *Aggregatum* group). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 31, p. 7440-5, 2013.

TSUZUKI, J. K.; SVIDZINSKI, T. I.; SHINOBU, C. S.; SILVA, L. F.; RODRIGUES-FILHO, E.; CORTEZ, D. A.; FERREIRA, I. C. Antifungal activity of the extracts and saponins from *Sapindus saponaria* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 4, p. 577-83, 2007.

VERZA, S. G. **Obtenção e caracterização de frações purificadas de saponinas de *Chenopodium quinoa* e avaliação da formação de complexos do tipo ISCOM – atividades biológicas das frações e dos complexos formados**. 2011. Tese (Doutorado em ciências farmacêuticas) Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

WHITE, R. L.; BURGESS, D. S.; MANDURU, M.; BOSSO, J. A. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: Time- kill, checkerboard, and E test. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 8, p. 1914-8, 1996.

WOLDEMICHAEL, G. M.; WINK, M. Identification and biological activities of triterpenoid saponins from *Chenopodium quinoa*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 2327-32, 2001.

YAWADIO, N. R.; KIKUZAKI, H.; KONISHI, Y. Antioxidant activity of various extracts and fractions of CHENOPODIUM QUINOA and *Amaranthus* spp. seeds. **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 760-6, 2008.

ZHU, L.; TAN, J.; WANG, B.; GUAN, L.; LIU, Y.; ZHENG, C. In-vitro Antitumor Activity and Antifungal Activity of Pennogenin Steroidal Saponins from *Polyphylla* var. *yunnanensis*. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 2, p. 279-86, 2011.

CAPITULO 2. Artigo

A ser submetido

INTRODUÇÃO

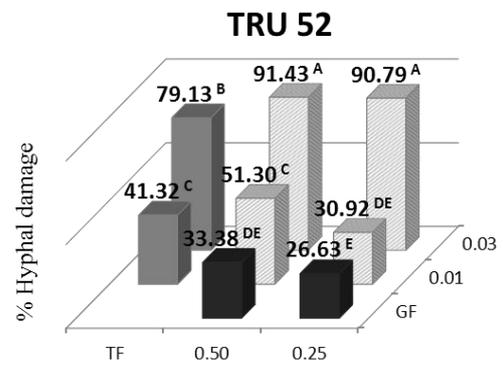
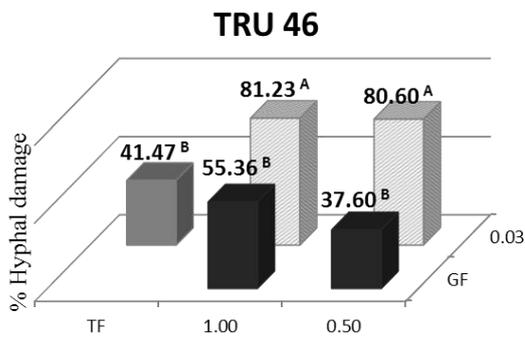
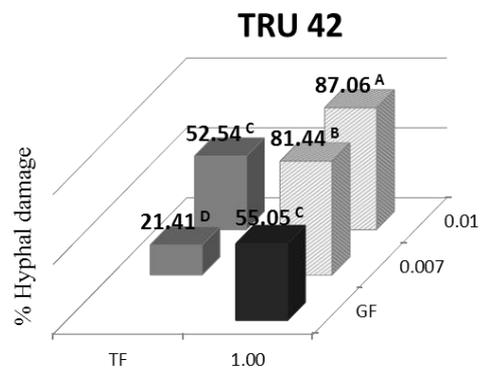
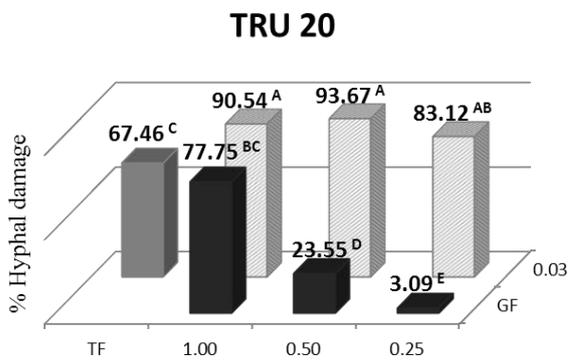
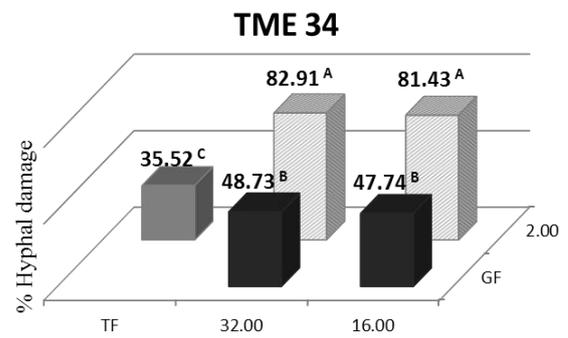
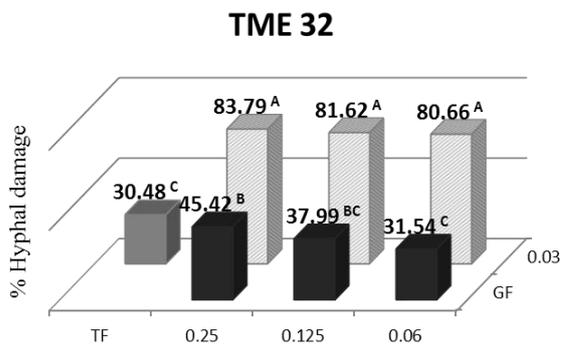
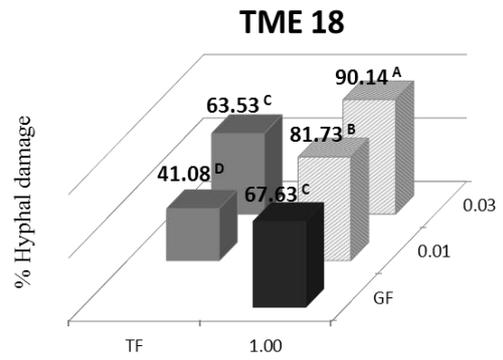
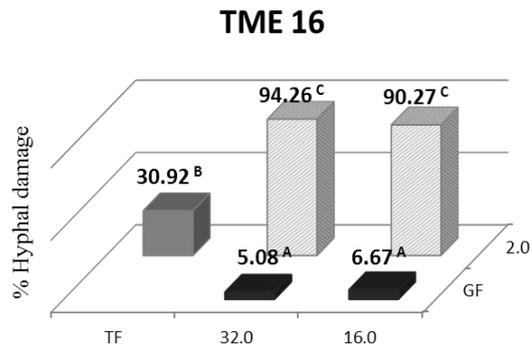
Um aumento considerável da resistência a muitos fármacos disponíveis no mercado, com a griseofulvina e terbinafina, tem ganhado importância clínica, atualmente. Além disso, resistência simultânea a múltiplos antifúngicos tem se revelado como um relevante problema emergente no setor da saúde pública (MARTINEZ-ROSSI *et al.*, 2008).

Entretanto, é importante destacar que em estudos realizados com bactérias e leveduras a associação de fármacos diminui o desenvolvimento de resistência, e pode também reverter esse cenário. Os tratamentos utilizando combinações de fármacos antifúngicos se revelou mais eficaz contra isolados resistentes quando comparado a isolados sensíveis. Além disso, os isolados tendem a adquirir resistência mais dificilmente à associação de fármacos quando comparado à monoterapia, uma vez que na associação vários mecanismos de adaptações deveriam ser desenvolvidos pelos fungos. Com isso, as associações terapêuticas podem se tornar a melhor alternativa de tratamento (ALVES *et al.*, 2012; VILCHÈZE; JACOBS JR., 2012).

Nesse contexto, a combinação de fármacos antifúngicos com diferentes mecanismos de ação tem se revelado importante para o tratamento de dermatofitoses refratárias ou resistentes. Portanto, este capítulo trata da avaliação da atividade da associação de griseofulvina (GF) e terbinafina (TF) dentro e fora das células. Para isso foram empregadas técnicas de DSC, IV e microscopia eletrônica.

Este capítulo é apresentado na forma de artigo a ser submetido para publicação no periódico *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.

ANEXO



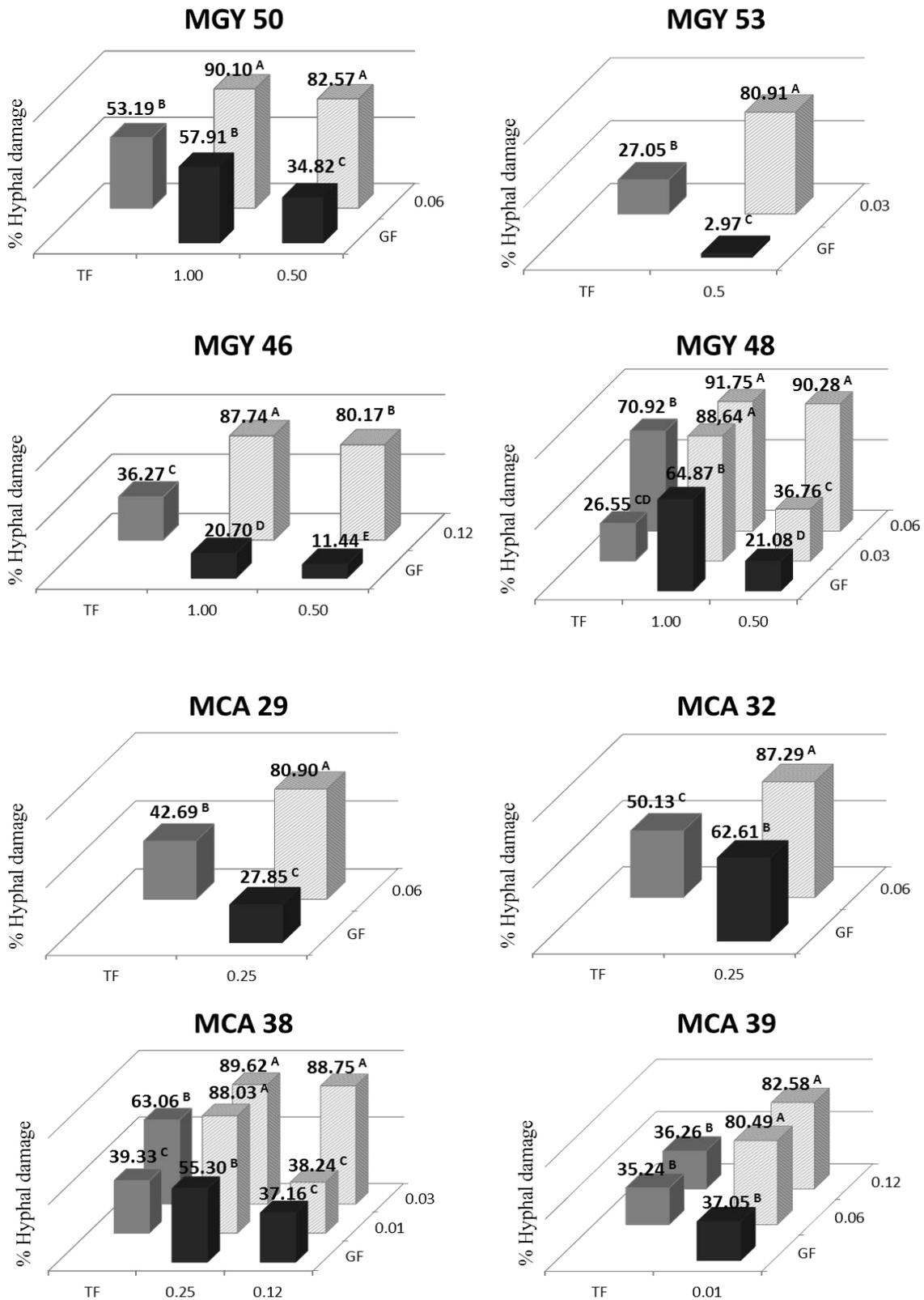


Figure 7. Percentage of isolated cell damage measured by assay checkerboard with MTT front of GF and TF alone and in combination. The horizontal axis shows the concentration of GF and the depth axis shows the concentration of TF. The vertical axis represents cell damage. The code of the isolate is shown above each graph. Different letters represents results statistically different, to p value < 0.05.

DISCUSSÃO GERAL

A presente dissertação foi desenvolvida tendo como referência os relatos da presença de saponinas nas sementes de *C. quinoa*, bem como as diversas atividades biológicas atribuídas a essa classe de substâncias, em especial, seu potencial efeito antifúngico (WOLDEMICHAEL; WINK, 2001; STUARDO; SAN MARTÍN, 2008). Desta forma, o primeiro capítulo desta dissertação destinou-se a obtenção das frações purificadas de saponinas, FQ70 e FQ90, com o intuito de verificar o efeito da atividade antifúngica de cada fração contra isolados de dermatófitos procedentes da Micoteca desta Faculdade.

As saponinas são uma classe de substâncias anfifílicas capazes de formar poros nas bicamadas celulares lipídicas, ao se ligarem ao ergosterol da membrana, aumentando assim a permeabilidade celular e levando ao extravasamento do conteúdo da célula (SIMONS *et al.*, 2006).

Coleman e colaboradores (2010) relataram uma clara atividade antifúngica para saponinas derivadas do barrigenol, destacando a sua potencialização para a associação dessas saponinas com fluconazol. Devido a esta característica, esperava-se, em nosso trabalho, encontrar atividade antidermatofítica para as frações de saponinas de quinoa. Porém, contrariando estudos anteriores, as frações de saponinas do estudo não apresentaram efeito inibitório sobre os dermatófitos, descartando a participação de saponinas de quinoa derivadas da hederagenina, do ácido fitolacagênico, ácido serjânico e do ácido oleanólico - componentes majoritários das frações de saponinas da quinoa.

Da mesma forma ficou descartada a hipótese das micelas formadas pelas saponinas das frações FQ70 e FQ90 de quinoa virem a modificar positivamente a atividade da griseofulvina e da terbinafina. Em nenhum dos casos pôde ser constatada reversão da resistência a ambos antifúngicos nas espécies de dermatófitos testadas.

O segundo capítulo desta dissertação trata da atividade dos antifúngicos TF e GF contra isolados resistentes de dermatófitos, após ter sido testado de forma isolada e em combinação. Na etapa inicial, destinada à determinação dos valores de CIM de TB

e GF, foi possível corroborar a detecção de isolados de dermatófitos resistente a ambos fármacos.

A GF apresentou valor médio de CIM dentro da faixa de eficácia do fármaco para todas as espécies testadas, porém sete isolados (dois de MCA, um de MGY, e dois de TME e TRU) mostraram valores de CIM superiores a 32 $\mu\text{g/mL}$, acima de 3 $\mu\text{g/mL}$ que é o limite de resistência para GF (ARTIS *et al.*, 1981). Resultados similares de resistência foram também observados por outros autores (SCHOLZ; MEINHOF, 1991; CHADEGANIPOUR *et al.*, 2004; GALUPPI *et al.*, 2010; NARDONI *et al.*, 2013). De modo geral, os dermatófitos testados foram mais susceptíveis a TF, apresentando CIM próximos a 0,06 $\mu\text{g/mL}$. Desses, somente dois isolados, TME 16 e TME 34, foram resistentes, ultrapassando o valor de CIM ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$, considerado o *breakpoint* de resistência para este fármaco (MUKHERJEE *et al.*, 2003). Esses dois isolados, por terem valores de CIM superiores a 3 $\mu\text{g/mL}$ para GF, também foram tidos como resistentes a esse fármaco. Dessa forma, pôde ser constatada a detecção de dois isolados multirresistentes. Destaca-se a importância deste achado, por ser, até o presente, o primeiro relato de um isolado clínico de dermatófito resistente simultaneamente a GF e TF.

Uma possível explicação das diferenças na susceptibilidade dos isolados testados seria a desigual prevalência de resistência alavancada por diferentes mecanismos de ação, uma vez que GF é fungistático e TF fungicida. Esta ideia foi proposta por Andes *et al.* (2006) que, ao avaliar a dose de antimicrobiano que impedisse o surgimento de populações resistentes, constatou que um agente fungicida, como é o caso da TF, reduzia efetivamente no tamanho da população de patógenos, limitando a ocorrência de mutações. No entanto, agentes fungistáticos, como GF, não reduzem efetivamente o tamanho da população, favorecendo assim o aparecimento de mutações capazes de conduzir a um quadro de resistência. Pelo contrário, a natureza fungicida de TF torna mais difícil o surgimento de resistência. Assim, a resistência simultânea a GF e TF surge como uma ocorrência pouco provável.

Outra possível alternativa de explicação para a resistência simultânea a TB e GF pode estar vinculada a um mecanismo de resistência comum a ambos fármacos. O fato observado nos isolados resistentes somente a GF, que mostram um aumento de até 16 vezes o valor da CIM para TF (sem chegar a atingir o CIM de resistência), sugeriu a possível existência de mecanismos conexos. Em estudo realizado com *T. rubrum* submetido a um tratamento mutagênico (FACHIN *et al.*, 1996), os autores relataram resistência simultânea para griseofulvina e tioconazol, sugerindo que fenômenos semelhantes de resistência a múltiplos fármacos poderiam estar envolvidos. Um provável mecanismo dessa resistência múltipla é a bomba de efluxo, da classe dos transportadores ABC, antes codificado para a espécie de *T. rubrum* como sendo um modulador da sensibilidade a vários antifúngicos (FACHIN *et al.*, 1996).

Porém, os resultados obtidos para o teste de bomba de efluxo ABC com verapamil, realizado com os isolados TME 16 e TME 34 (*T. mentagrophytes*) não evidenciaram a participação deste mecanismo de resistência, corroborando com PAIÃO *et al.* (2007). Segundo esse autor, mutações em outros genes capazes de produzir substâncias, como a hidrolase de éster carboxílico (TR0036) e uma proteína “Pol” (TR0002), poderiam também uma resposta não específica ao stress celular causado pelos fármacos. Por analogia, isso sugere que a multirresistência *in vitro* a TF e GF nesses isolados de *T. mentagrophytes* pode, eventualmente, envolver uma mutação em genes decorrente do estresse celular e virulência.

A avaliação mais aprofundada da ação antifúngica combinada de TF e GF foi realizada mediante avaliação do dano celular utilizando o método do *checkerboard* (usualmente aplicada para avaliar efeito sinérgico, aditivo, indiferença e antagonismo) e o MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio), como indicador da viabilidade celular. Por princípio, células viáveis reduzem por meio da enzima mitocondrial desidrogenase succínica o MTT, gerando como produto cristais de formazan de cor azul-púrpura (CHIOU *et al.*, 2001). Assim, uma menor intensidade de coloração é associada a um maior dano celular, e vice-versa.

No presente trabalho, os isolados susceptíveis a TF e GF manifestaram uma nítida redução na intensidade da cor, indicando um efetivo percentual de dano celular. Para os isolados resistentes a um dos antifúngicos não houve diferença de intensidade de cor o resultado em relação ao grupo controle. A associação da TF e GF exerceu um efeito de reversão de resistência para isolados multirresistentes, e para a maioria dos isolados sensíveis apresentou efeito aditivo. No caso dos isolados susceptíveis, uma vez que TF e GF atuam por mecanismos diferentes, é possível que a TF, por inibir a síntese do ergosterol, altere a integridade da membrana celular, facilitando a entrada da GF e potencializando seu efeito. Gupta e Kohli (2003) evidenciaram efeitos sinérgico e aditivo para a combinação de ciclopirox e terbinafina, porém encontraram indiferença para a maioria dos casos no estudo da combinação de ciclopirox e itraconazol. Polak (2009) também estudou a atividade da combinação de amorolfina com cetoconazol, griseofulvina e terbinafina e relatou que a combinação era sempre mais efetiva quando comparada à atividades dos antifúngicos isoladamente. Outros autores encontraram resultados similares, indicando que a combinação de amorolfina e itraconazol tem efeito sinérgico ou aditivo sobre a maioria das espécies de dermatófitos (Tamura *et al.*, 2013).

Entretanto, os relatos acima colocados não explicam a reversão da resistência simultânea a TB e GF, uma vez que isolados resistentes a GF e susceptíveis a TF mostram um aumento expressivo do valor da CIM, como antes mencionado.

A análise por microscopia em luz visível de hifas de definir qual isolados, selecionados como exemplo, corroboram os resultados *in vitro* do dano celular avaliado pelo método do *checkerboard* com MTT. Neste caso, o uso de TB e GF isoladamente causou menos modificações estruturais do que a combinação de ambos, principalmente em isolados sensíveis. As modificações observadas indicam um decréscimo na produção de novas hifas, cuja intensidade guarda relação com o percentual de dano celular observado.

Na análise do efeito dos fármacos na composição química do micélio do fungo por FT-IR, pôde-se notar que os todos tratamentos com TB e GF, sozinhos ou em

combinação, provocaram uma diminuição da intensidade das bandas associadas às proteínas e lipídeos, quando comparados com o controle não tratado. Para todos os tratamentos foi observado também um aumento na intensidade da banda de polissacáridos, próprio da ativação de mecanismos de desintoxicação e de resistência fúngica (BALDRIAN, 2003).

Ainda que pouco frequente na literatura, foi proposto neste trabalho a investigação de possíveis interações físico-químicas que ocorreriam, tipicamente, fora da célula. Um dos requisitos indispensáveis à absorção e permeação pela membrana celular é que o fármaco esteja em solução. Pelo contrário, a precipitação do fármaco comprometeria a sua biodisponibilidade e isso pode ocorrer ainda no sítio de ação, sobretudo com fármacos pouco solúveis, como griseofulvina. O processo envolve uma sequência de três etapas: (a) realização de supersaturação, (b) a formação de núcleos de cristais, e (c) subsequente crescimento de cristais (RODRIGUEZ-HORNEDO; MURPHY, 1999).

Alterações de solubilidade ou de isomerização também podem ocorrer durante o período de incubação em testes *in vitro* realizados com células (KAISER, 2012). O monitoramento da solubilidade da GF permitiu detectar insolubilidade dessa acima de 10 µg/mL, no decorrer da incubação do ensaio de suscetibilidade *in vitro*. A análise por CLAE das frações solúvel e insolúvel permitiu constatar que aproximadamente 80% da concentração inicial de 50 µg/mL de GF precipita no meio de cultura a 32 °C. Este dado levanta questionamentos sobre relatos de resistência a este antifúngico a concentrações de 10 µg/mL, utilizando o mesmo meio de cultura (ARTIS *et al.*, 1981; FACHIN *et al.*, 1996). É bastante provável que as concentrações de resistência relatadas se devam a uma questão de solubilidade e não a uma resistência exagerada a GF.

Como produto biotecnológico, a griseofulvina é comercializada contendo as impurezas decolorgriseofulvina, deidrogriseofulvina, diidrogriseofulvina, tetraidrogriseofulvina, ácido griseofulvico e isogriseofulvina. A análise por CLAE da fração insolúvel (precipitado formado durante o período de incubação) demonstrou

concentrações inferiores das impurezas Imp 1 (estrutura desconhecida), ácido griseofúlvico, declorogriseofulvina, deidrogrioseofulvina, em relação à fração solúvel (0%, 10%, 50%, 55%, respectivamente). Porém, a precipitação de GF na presença de terbinafina mostrou que a impureza declorogriseofulvina torna-se aproximadamente 20% mais solúvel, quando comparado à sua concentração na fração solúvel após precipitação da griseofulvina sozinha.

Uma vez que alterações na solubilidade de uma substância na presença de outra indicam a possibilidade de interações moleculares, na sequência deste trabalho foi investigada a possibilidade da ocorrência deste fenômeno. Para isso, foram utilizados métodos por calorimetria diferencial exploratória (DSC), espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR) e microscopia eletrônica de varredura dos dois antifúngicos sozinhos e em mistura liofilizada.

A comparação dos termogramas para a mistura de TB e GF mostrou significativas diferenças em relação aos termogramas das substâncias analisadas isoladamente (Figura 6 do Capítulo 2) Este tipo de comportamento sugere a formação de um composto (possibilidade descartada pela análise por CLAE) ou de um produto de interação similar ao observado na formação de complexos. Um aspecto importante a ser destacado é a relação deste comportamento em função das diferentes proporções ponderais analisadas, dadas as alterações e deslocamentos nos processos endotérmicos decorrentes da mistura. Alterações similares foram relatadas para a combinação de griseofulvina com ácidos fracos (CHIOU; NIAZI, 1978), as quais foram associadas à formação de misturas eutéticas (GILL; VULFSON, 1994).

De igual forma, a análise por FT-IR indica uma marcada diferença espectral entre TB e GF e a mistura de ambas substâncias. As alterações observadas no padrão das bandas de absorção sugerem uma interação entre a cetona da GF e a tripla ligação da TF. O desaparecimento das bandas dos compostos aromáticos no espectro da mistura sugere uma possível interação entre as ligações π dos anéis aromáticos dos dois compostos.

As análises por MEV mostram também alterações significativas nos hábitos cristalino de TB e GF, quando em mistura. Principalmente, cabe destacar a mudança na forma cristalina da TF de placa para agulha na presença de GF. Uma vez que se trata de análises de misturas, não é possível afirmar a ocorrência de polimorfismo. Entretanto, as alterações registradas nos termogramas por DSC deixam claro o envolvimento de processos energéticos mais fortes do que uma simples alteração de hábito cristalino, como relatado para TF (KUMINEK, 2013) e GF (CARR *et al.*, 2010).

Os dados obtidos nos testes físico-químicos, quando comparados ao caso dos dois isolados multirresistentes (TME 16 e TME 34), permitem propor a participação de uma forte interação molecular entre GF e TB, a que poderia evadir o mecanismo de resistência baseado, presumivelmente, no não-reconhecimento de TF e GF na forma de um complexo molecular formado por parte dos isolados multirresistentes. Com isso, dois desdobramentos seriam possíveis: (a) a entrada da TF e GF na célula na forma de complexo, seguida de uma posterior desestruturação desse complexo em nível de membrana, favorecendo os mecanismos de ação individuais; (b) permanência do complexo no interior da célula na forma não-dissociada, que passaria assim a atuar por um mecanismo de ação diferente.

Cabe ainda salientar que essa proposta não exclui a participação de mecanismos de resistência propriamente ditos, isto é, em nível celular. Essa possibilidade se constata no fato de a formação de complexo com a TF não ter sido capaz de reverter a resistência em cinco isolados resistentes apenas a GF. Isso sugere a existência de outras possibilidades a serem consideradas em trabalhos posteriores. É provável que o mecanismo por trás da reversão da resistência seja mais específico para a GF ou que o mesmo tenha surgido de comportamentos celulares específicos, segundo o isolado em estudo.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- ✓ O perfil de susceptibilidade da griseofulvina e terbinafina frente a 42 isolados de micoses superficiais permitiu a obtenção de sete isolados resistentes a griseofulvina e dois isolados de *T. mentagrophytes* multirresistentes. Contrariamente, grupo de saponinas encontradas na *C. quinoa* não apresentou atividade antifúngica para as espécies de dermatófitos testadas;
- ✓ Na avaliação da combinação entre griseofulvina e terbinafinas obtivemos atividade aditiva para a maioria dos isolados testados, cabe destacar que esta associação também foi capaz de reverter a multirresistência de dois isolados;
- ✓ O efeito da associação de terbinafina e griseofulvina puderam ser constatados no exame ao microscópio da morfologia das hifas;
- ✓ Griseofulvina e terbinafina provocaram alterações na composição química do micélio do fungo avaliado por FT-IV, sobretudo das proteínas e dos lipídeos associados à membrana da hifa;
- ✓ A análise comparativa de terbinafina e griseofulvina por DSC, FT-IR e MEV, isoladamente e em associação, indicam uma forte interação molecular entre ambos fármacos e sugerem a formação de um complexo. Esta constatação caracteriza um evento fora da membrana celular, que pode estar relacionado com a reversão da resistência a ambos antifúngicos, observada em dois isolados multirresistentes;
- ✓ O aumento da solubilidade da declorogriseofulvina quando em mistura com a terbinafina, merece atenção como fato complementar a ser considerado na reversão da multirresistência;
- ✓ A ausência de relatos na literatura similares sobre a resistência simultânea a TB e GF, assim como a interação desses dois fármacos em nível molecular, fora da célula, e sua possível relação com a reversão da resistência não foram descritos na literatura e merecem a atenção de estudos futuros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJELLO L. A taxonomic review of the dermatophytes and related species. **Sabouraudia**, v. 6, n. 2, p. 147-59, 1968.

ALMEIDA JÚNIOR, J. N.; CANÇÃO, A. T. W.; CAMPOS, S. V.; STRABELLI, T. M. V.; DEL NEGRO, G. M.; FIGUEIREDO, D. S. Y.; MOTTA, A. L.; ROSSI, F.; GUITARD, J.; BENARD, G.; HENNEQUIN, C. Invasive *Trichosporon* infection in solid organ transplant patients: a report of two cases identified using IGS1 ribosomal DNA sequencing and a review of the literature. **Transplant Infectious Disease**, 2014.

ALVES, I. A.; BANDEIRA, L. A.; MARIO, D. L. N.; DENARDI, L. B.; NEVES, L. V.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. Effects of Antifungal Agents Alone and in Combination Against *Candida glabrata* Strains Susceptible or Resistant to Fluconazole. **Mycopathologia**, v. 174, n. 3, p. 215–221, 2012.

ANDES, D.; FORREST, A.; LEPAK, A.; NETT, J.; MARCHILLO, K.; LINCOLN, L. Impact of antimicrobial dosing regimen on evolution of drug resistance in vivo: fluconazole and *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 7, p. 2374-83, 2006.

ANISIMOV, M. M.; CIRVA, V. J. [The biological evaluation of triterpene glycosides (author's transl)]. **Pharmazie**, v. 35, n. 12, p.731-8, 1980.

AQUINO, V. R.; CONSTANTE, C. C.; BAKOS, L. Frequência das dermatofitoses em exames micológicos em Hospital Geral de Porto Alegre, Brasil. Frequency of dermatophytosis in mycological examinations at a general hospital in Porto Alegre, Brazil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 3, p. 239, 2007.

ARTIS, W. M.; ODLE, B. M.; JONES, H. E. Griseofulvin-resistant dermatophytosis correlates with in vitro resistance. **Archives of Dermatology**, v. 117, n. 1, p. 16-9, 1981.

BAATH, N. S.; HONG, J.; SATTAR, S. P. Possible carbamazepine toxicity with terbinafine. **The Canadian Journal of Clinical Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 228-31, 2006.

BALDRIAN, P. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 1, p. 78-91, 2003.

BERKOVITCH-YELLIN, Z. Toward an ab initio derivation of crystal morphology. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, p. 8239-8253, 1985.

BIABIANY, M.; ROUMY, V.; HENNEBELLE, T.; FRANÇOIS, N.; SENDID, B.; POTTIER, M.; et al. Antifungal activity of 10 Guadeloupean plants. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 11, p. 1640-5, 2013.

BRILHANTE, R. S.; ROCHA, M. F.; CORDEIRO, R. A.; RABENHORST, S. H.; GRANJEIRO, T. B.; MONTEIRO, A. J.; et al. Phenotypical and molecular characterization of *Microsporum canis* strains in north-east Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 4, p. 776-82, 2005.

BRITTAIN, H. G. Polymorphism and solvatomorphism 2010. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 2, p. 464-84, 2012.

CANNON, R. D.; LAMPING, E.; HOLMES, A. R.; NIIMI, K.; BARET, P. V.; KENIYA, M. V.; et al. Efflux-mediated antifungal drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 2, p. 291-321, 2009.

CARR, A. G.; MAMMUCARI, R.; FOSTER, N. R. Solubility and Micronization of Griseofulvin in Subcritical Water. **Industrial ; Engineering Chemistry Research**, v. 49, p. 3403–3410, 2010.

CERVELATTI, E. P.; FERREIRA-NOZAWA, M. S.; AQUINO-FERREIRA, R.; FACHIN, A. L.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. Electrophoretic molecular karyotype of the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 1, p. 99-102, 2004.

CHADEGANIPOUR, M.; NILIPOUR, S.; HAVAEI, A. In vitro evaluation of griseofulvin against clinical isolates of dermatophytes from Isfahan. **Mycoses**, v. 47, n. 11-12, p. 503-7, 2004.

CHIOU, C. C ; MAVROGIORGOS, N. ; TILLEM, E. ; HECTOR, R. ; WALSH, T. J. Synergy, pharmacodynamics, and time-sequenced ultrastructural changes of the interaction between nikkomycin Z and the echinocandin FK463 against *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 12, p. 3310-21, 2001.

CHIOU, W. L.; NIAZI, S. Pharmaceutical applications of solid dispersion systems: Dissolution of griseofulvin–succinic acid eutectic mixture. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 65, n. 8, p. 1212–1214, 1976

COLEMAN, J. J.; OKOLI, I. ; TEGOS, G. P. ; HOLSON, E. B. ; WAGNER, F. F. ; HAMBLIN, M. R. ; MYLONAKIS, E. Characterization of plant-derived saponin natural products against *Candida albicans*. **ACS Chemical Biology**, v. 5, n. 3, p. 321-32, 2010.

CORTEZ, A. C.; DE SOUZA, J. V.; SADAHIRO, A.; DE OLIVEIRA, J. A. Frequency and a etiology of dermatophytosis in children age 12 and under in the state of Amazonas, **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 29, n. 4, p. 223-6, 2012.

COSTA, M.; PASSOS, X. S.; SOUZA, L. K.; MIRANDA, A. T.; LEMOS, J. A.; OLIVEIRA JR, J. G.; et al. Epidemiologia e etiologia das dermatofitoses em Goiânia,

GO, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 1, p. 19-22, 2002.

D'COSTA, V. M.; KING, C. E.; KALAN, L.; MORAR, M.; SUNG, W. W.; SCHWARZ, C.; FROESE, D.; ZAZULA, G.; CALMELS, F.; DEBRUYNE, R.; GOLDING, G. B.; POINAR, H. N.; WRIGHT, G. D. Antibiotic resistance is ancient. **Nature**, v. 477, n. 7365, p. 457-61, 2011.

DE GIOANNIS, B.; JESTIN, P.; SUBRA, P. Morphology and growth control of griseofulvin recrystallized by compressed carbon dioxide as antisolvent. **Journal of Crystal Growth**, v. 262, n. 1-4, p. 519-26, 2004.

DE ROSSI, E.; AÍNSA, J. A.; RICCARDI, G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 1, p. 36-52, 2006.

DEI CAS, E.; VERNES, A. Parasitic adaptation of pathogenic fungi to mammalian hosts. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 173-218, 1986.

DENNING, D.W. Echinocandin antifungal drugs. **The Lancet**, v. 362, p. 1142-51, 2003.

ESPINEL-INGROFF, A. Novel antifungal agents, targets or therapeutic strategies for the treatment of invasive fungal diseases: a review of the literature (2005-2009). **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 1, p 15-22, 2009.

ESQUENAZI, D.; ALVIANO, C. S.; DE SOUZA, W.; ROZENTAL, S. The influence of surface carbohydrates during in vitro infection of mammalian cells by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 3, p. 144-53, 2004.

European Medicines Agency, Guidelines on Setting Specifications for Related Impurities in Antibiotics, EMEA, London, 2012.

FACHIN, A. L.; MAFFEI, C. M.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. In vitro susceptibility of *Trichophyton rubrum* isolates to griseofulvin and tioconazole. Induction and isolation of a resistant mutant to both antimycotic drugs. Mutant of *Trichophyton rubrum* resistant to griseofulvin and tioconazole. **Mycopathologia**, v. 135, n. 3, p. 141-3, 1996.

FACHIN, A. L.; MAFFEI, C. M.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. In vitro susceptibility of *Trichophyton rubrum* isolates to griseofulvin and tioconazole. Induction and isolation of a resistant mutant to both antimycotic drugs. Mutant of *Trichophyton*

rubrum resistant to griseofulvin and tioconazole. **Mycopathologia**, v. 135, n. 3, p. 141-3, 1996.

FAVRE, B.; RYDER, N. S. Cloning and expression of squalene epoxidase from the pathogenic yeast *Candida albicans*. **Gene**, v. 189, n. 1, p. 119-26, 1997.

FAVRE, B.; RYDER, N. S. Cloning and expression of squalene epoxidase from the pathogenic yeast *Candida albicans*. **Gene**, v. 189, n. 1, p. 119-26, 1997.

FDA, 'Draft ± guidance for industry: in vivo drug metabolism/drug interaction studies ± study design, data analysis, and recommendations for dosing and labeling', US Department of Health, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research Clin/ Pharm, November 1998.

FENG, T.; BATES, S.; CARVAJAL, M. T. Toward understanding the evolution of griseofulvin crystal structure to a mesophase after cryogenic milling. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 367, n. 1-2, p. 16-9, 2009.

FLEECE, D.; GAUGHAN, J. P.; ARONOFF, S. C. Griseofulvin versus terbinafine in the treatment of *tinea capitis*: a meta-analysis of randomized, clinical trials. **Pediatrics**, v. 114, n. 5, p. 1312-5, 2004.

FRANGOULIS, E.; ATHANASOPOULOU, B.; KATSAMBAS, A. Etiology of *tinea capitis* in Athens, Greece -- a 6-year (1996-2001) retrospective study. **Mycoses**, v. 47, n. 5-6, p. 208-12, 2004.

GALUPPI, R. GAMBARARA, A.; BONOLI, C.; OSTANELLO, F.; TAMPIERI, M. P. Antimycotic effectiveness against dermatophytes: comparison of two in vitro tests. **Veterinary Research Communications**, v. 34, p. S57-61, 2010.

GEORGOPAPADAKOU, N. H.; WALSH, T. J. Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 2, p. 279-91, 1996.

GHANNOUM, M. A.; HAJJEH, R. A.; SCHER, R.; KONNIKOV, N.; GUPTA, A. K.; SUMMERBELL, R.; et al. A large-scale North American study of fungal isolates from nails: the frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 43, n. 4, p. 641-8, 2000.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 501-17, 1999.

GIDDEY, K.; MONOD, M.; BARBLAN, J.; POTTS, A.; WARIDEL, P.; ZAUGG, C.; et al. Comprehensive analysis of proteins secreted by *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton violaceum* under in vitro conditions. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 8, p. 3081-92, 2007.

GILL, I.; VULFSON, E. Enzymic catalysis in heterogeneous eutectic mixtures of substrates. **Trends in Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 118-22, 1994.

GINTER-HANSELMAYER, G.; WEGER, W.; ILKIT, M.; SMOLLE, J. Epidemiology of tinea capitis in Europe: current state and changing patterns. **Mycoses**, v. 50 Suppl 2, p. 6-13, 2007.

GROLL, A. H.; SILLING, G.; YOUNG, C.; SCHWERDTFEGER, R.; OSTERMANN, H.; HEINZ, W. J.; GERSS, J.; KOLVE, H.; LANVERS-KAMINSKY, C.; VIEIRA PINHEIRO, J. P.; GAMMELIN, S.; CORNELLY, O. A.; WUERHWEIN, G. Randomized comparison of safety and pharmacokinetics of caspofungin, liposomal amphotericin B, and the combination of both in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 10, p.4143-9, 2010.

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**, v. 149, n. 2, p. 296-305, 2003.

GUPTA, A. K.; COOPER, E. A. Update in antifungal therapy of dermatophytosis. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 353-67, 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, 2013a.

GUPTA, A. K.; PAQUET, M.; SIMPSON, F. C. Therapies for the treatment of onychomycosis. **Clinics in Dermatology**, v. 31, n. 5, p. 544-54, 2013b.

HAVLICKOVA B., CZAIIKA V.A., FRIEDRICH M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. **Mycoses**, v. 51, n. 4, p. 2-15, 2008.

HENAO-MARTÍNEZ, A. F.; CASTILLO-MANCILLA, J. R.; BARRON, M. A.; NICHOL, A. C. Combination Antifungal Therapy in the Treatment of *Scedosporium apiospermum*. Central Nervous System Infections. **Case Reports in Infectious Diseases**, v. 2013, p. 4 pages, 2013

HERLT, A. J.; MANDER, L. N. ; PONGO, E. ; RUMAMPUK, R. J. ; TARIGAN, P. Two major saponins from seeds of *Barringtonia asiatica*: putative antifeedants toward *Epilachna* sp. larvae. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 2, p. 115-20, 2002.

HIGGINS, E. M.; FULLER, L. C.; SMITH, C. H. Guidelines for the management of tinea capitis. British Association of Dermatologists. **British Journal of Dermatology**, v. 143, n. 1, p. 53-8, 2000.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. **Triterpene saponins – pharmacological and biological properties**. 1^a, editor. Cambridge: Cambridge University Press; 1995.

JARMER, D. J.; LENGSELD, C. S.; ANSETH, K. S.; RANDOLPH, T. W. Supercritical fluid crystallization of griseofulvin: crystal habit modification with a selective growth inhibitor. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 94, n. 12, p. 2688-702, 2005.

JOHNSON, M. D.; MACDOUGALL, C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PERFECT, J. R.; REX, J. H. Combination antifungal therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 693-715, 2004.

JOSEPH, N. M.; SISTLA, S.; DUTTA, T. K.; BADHE, A. S.; RASITHA, D.; PARIJA, S. C. Ventilator-associated pneumonia in a tertiary care hospital in India: role of multi-drug resistant pathogens. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 4, n. 4, p. 218-25, 2010.

KAHSAY, G.; ADEGOKE, A. O.; VAN SCHEPDAEL, A.; ADAMS, E. Development and validation of a reversed phase liquid chromatographic method for analysis of griseofulvin and impurities. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 80, p. 9-17, 2013.

KAISER, S. **Isomerização dos alcalóides oxindólicos de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. (Unha-de-Gato) induzida por fatores tecnológicos e sua influência sobre a atividade citotóxica em linhagens de células tumorais de bexiga T24 e RT4**. 2012. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

KANG, J.; PARK, J.; CHOI, H.; BURLA, B.; KRETZSCHMAR, T.; LEE, Y.; et al. Plant ABC Transporters. **Arabidopsis Book**, v. 9, p. e0153, 2011.

KEUKENS, E. A.; DE VRIJE, T.; VAN DEN BOOM, C.; DE WAARD, P.; PLASMAN, H. H.; THIEL, F.; et al. Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption. **Biochim Biophys Acta**, v. 1240, n. 2, p. 216-28, 1995.

KNASMÜLLER, S.; PARZEFALL, W.; KASSIER, F.; ECKER, S.; SCHULTE, H. R. Toxic effects of griseofulvin: disease models, mechanisms, and risk assesment. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 27: p. 495-537.1997.

KUMINEK, G.; RAUBER, G. S.; RIEKES, M. K.; DE CAMPOS, C. E. M.; MONTI, G. A.; BORTOLUZZI, A. J.; CUFFINI, S. L.; CARDOSO, S. G. Single crystal structure, solid state characterization and dissolution rate of terbinafine hydrochloride. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 78–79, p. 105-111, 2013.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. Tratado de micologia médica Lacaz 2ª ed – São Paulo: Sarvier, 2002.

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

LEEM, S. H.; PARK, J. E.; KIM, I. S.; CHAE, J. Y.; SUGINO, A.; SUNWOO, Y. The possible mechanism of action of ciclopirox olamine in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecules and Cells**, v. 15, n. 1, p. 55–61, 2003.

MADL, T.; STERK, H.; MITTELBAACH, M. Tandem mass spectrometric analysis of a complex triterpene saponin mixture of *Chenopodium quinoa*. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 17, p. 795-806, 2006.

MAHIEU, A.; WILLART, J. F.; DUDOGNON, E.; EDDLESTON, M. D.; JONES, W.; DANEDE, F.; et al. On the polymorphism of griseofulvin: identification of two additional polymorphs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 2, p. 462-8, 2013.

MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T.; ROSSI, A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 369-83, 2008.

MATOS, S. B.; MARIANO, A. P. M. Onychomycosis in a Community of Garbage Collectors in Northeast Brazil. **Internet Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. 13, 2010.

MATSUMOTO, T.; AJELLO, L. Current taxonomic concepts pertaining to the dermatophytes and related fungi. **International Journal of Dermatology**, v. 26, n. 8, p. 491-9, 1987.

MEZZARI, A. Frequency of dermatophytes in the metropolitan area of Porto Alegre, RS, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 40, n. 2, p. 71-76, 1998.

MUKHERJEE, P. K.; LEIDICH, S. D.; ISHAM, N.; LEITNER, I.; RYDER, N. S.; GHANNOUM, M. A. Clinical Trichophyton rubrum strain exhibiting primary resistance to terbinafine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 82-6, 2003.

NARDONI, S.; MUGNAINI, L.; PAPINI, R.; FIASCHI, M.; MANCIANTI, F. Canine and feline dermatophytosis due to *Microsporum gypsum*: A retrospective study of

clinical data and therapy outcome with griseofulvin. **Journal of Medical Mycology**, v. 23, n. 3, p. 164-167, 2013.

NISHI, I.; SUNADA, A.; TOYOKAWA, M.; ASARI, S.; IWATANI, Y. In vitro antifungal combination effects of micafungin with fluconazole, voriconazole, amphotericin B, and flucytosine against clinical isolates of *Candida* species. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 15, n. 1, p. 1-5, 2009.

NURIMAR, C. F.; TIYOMI, A.; GLÓRIA, M. C. B. Dermatophytoses in children: study of 137 cases Dermatofitoses na criança: estudo de 137 casos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n. 2, p. 83, 2001.

NYILASI, I.; KOCSUBÉ, S.; KRIZSÁN, K.; GALGÓCZY, L.; PAPP, T.; PESTI, M.; et al. Susceptibility of clinically important dermatophytes against statins and different statin-antifungal combinations. **Medical Mycology**, 2013.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J.; GOW, N. A. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 272-9, 2003.

OGAWA, H.; SUMMERBELL, R. C.; CLEMONS, K. V.; KOGA, T.; RAN, Y. P.; RASHID, A.; et al. Dermatophytes and host defence in cutaneous mycoses. **Medical Mycology**, v. 36 Suppl 1, p. 166-73, 1998.

ONYEWU, C.; BLANKENSHIP, J. R.; DEL POETA, M.; HEITMAN, J. Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 3, p. 956-64, 2003.

OSHEROV, N.; KONTOYIANNIS, D. P.; ROMANS, A.; MAY, G. S. Resistance to itraconazole in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus* is conferred by extra copies of the A. nidulans P-450 14 α -demethylase gene, pdmA. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 75-81, 2001.

OSBORNE, C. S.; LEITNER, I.; HOFBAUER, B.; FIELDING, C. A.; FAVRE, B.; RYDER, N. S. Biological, biochemical, and molecular characterization of a new clinical *Trichophyton rubrum* isolate resistant to terbinafine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 6, p. 2234-6, 2006.

PAIÃO, F. G.; SEGATO, F.; CURSINO-SANTOS, J. R.; PERES, N. T.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. Analysis of *Trichophyton rubrum* gene expression in response to cytotoxic drugs. **FEMS Microbiology Letters**, v. 271, n. 2, p. 180-6, 2007.

POLAK, A. Combination of amorolfine with various antifungal drugs in dermatophytosis. **mycoses**, v. 36, n. 1-2, p. 43-49, 2009.

PRANTEDA, G.; MUSCIANESE, M.; GRIMALDI, M.; TUZI, M.; FIDANZA, L.; TAMBURI, F.; et al. Pharmacological management of pediatric Kerion celsi. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 26, n. 4, p. 973-6, 2013.

RASENACK, N.; HARTENHAUER, H.; MÜLLER, B. W. Microcrystals for dissolution rate enhancement of poorly water-soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 254, p. 137-145, 2003.

ROCHA, E. M.; ALMEIDA, C. B.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. Identification of genes involved in terbinafine resistance in *Aspergillus nidulans*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 228-32, 2002.

RODRIGUEZ-HORNEDO, N.; MURPHY, D. Significance of controlling crystallization mechanisms and kinetics in pharmaceutical systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, n. 7, p. 651-60, 1999.

RYDER, N. S. Terbinafine: mode of action and properties of the squalene epoxidase inhibition. **British Journal of Dermatology**, v. 126 Suppl 39, p. 2-7, 1992.

SAHA, S.; DHANASEKARAN, D.; CHANDRALEKA, S.; PANNEERSELVAM, A. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of cobalt metal complex against multi drug resistant bacterial and fungal pathogens. **Physics, Chemistry and Technology**, v. 7, N. 1, p. 73 - 80, 2009.

SAN MARTÍN, R.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. Novel molluscicide against *Pomacea canaliculata* based on quinoa (*Chenopodium quinoa*) saponins. **Crop Protection**, v. 27, n. 3-5, p. 310-9, 2008.

SCHOLZ, R.; MEINHOF, W. Susceptibility of *Trichophyton rubrum* to griseofulvin. **Mycoses**, v. 34, n. 9-10, p. 411-4, 1991.

SIDRIN, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B.; ROCHA, M. F. B. **Entendendo os ramos de interesse da micologia médica. In: Micologia Médica à luz de autores contemporâneos.** Guanabara Koogan ed. 26 p, 2004.

SILVEIRA-GOMES, F.; DE OLIVEIRA, E. F.; NEPOMUCENO, L. B.; PIMENTEL, R. F.; MARQUES-DA-SILVA, S. H.; MESQUITA-DA-COSTA, M. Dermatophytosis diagnosed at the Evandro Chagas Institute, Pará, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 443-6, 2013.

SIMONS, V.; MORRISSEY, J. P.; LATIJNHOUWERS, M.; CSUKAI, M.; CLEAVER, A.; YARROW, C.; OSBOURN, A. Dual effects of plant steroidal alkaloids on *Saccharomyces cerevisiae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 8, p. 2732-40, 2006.

SPARG, S. G.; LIGHT, M. E.; VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 2, p. 219-43, 2004.

STUARDO, M.; SAN MARTÍN, R. Antifungal properties of quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*) alkali treated saponins against *Botrytis cinerea*. **Industrial Crops and Products**, v.27, n. 3, p. 296-302, 2008.

TAMURA, T.; ASAHARA, M.; YAMAMOTO, M.; YAMAURA, M.; MATSUMURA, M.; GOTO, K.; et al. In vitro susceptibility of dermatomycoses agents against six antifungal drugs and evaluation of combined effects of amorolfine and itraconazole using fractional inhibitory concentration index in dermatophytes. **Microbiology and Immunology**, 2013.

TEY, H. L.; TAN, A. S.; CHAN, Y. C. Meta-analysis of randomized, controlled trials comparing griseofulvin and terbinafine in the treatment of tinea capitis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 64, n. 4, p. 663-70, 2011.

TOCCI, N.; D'AURIA, F. D.; SIMONETTI, G.; PANELLA, S.; PALAMARA, A. T.; DEBRASSI, A.; et al. Bioassay-guided fractionation of extracts from *Hypericum perforatum* in vitro roots treated with carboxymethylchitosans and determination of antifungal activity against human fungal pathogens. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 70, p. 342-7, 2013.

TRASI, N. S.; BOERRIGTER, S. X.; BYRN, S. R. Investigation of the milling-induced thermal behavior of crystalline and amorphous griseofulvin. **Pharmaceutical Research**, v.27, n.7, n. 1377-89, 2010.

TRISSEL, L. A.; OGUNDELE, A. B. Compatibility of anidulafungin with other drugs during simulated Y-site administration. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 62, n. 8, p. 834-7, 2005.

VAN DUYN GRAHAM, L.; ELEWSKI, B. E. Recent updates in oral terbinafine: its use in onychomycosis and tinea capitis in the US. **Mycoses**, v. 54, n. 6, p. e679-85, 2011.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 26, 2012.

VENA, G. A.; CHIECO, P.; POSA, F.; GAROFALO, A.; BOSCO, A.; CASSANO, N. Epidemiology of dermatophytoses: retrospective analysis from 2005 to 2010 and comparison with previous data from 1975. **New Microbiologica**, v. 35, n. 2, p. 207-13, 2012.

VILCHÈZE, C.; JACOBS JR., W. R. The Combination of Sulfamethoxazole, Trimethoprim, and Isoniazid or Rifampin Is Bactericidal and Prevents the Emergence of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 56, n. 10, p. 5142, 2012.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R. C. The dermatophytes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 2, p. 240-59, 1995.

WHITE, T. C.; OLIVER, B. G.; GRASER, Y.; HENN, M. R. Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 8, p. 1238-45, 2008.

WOLDEMICHAEL, G. M.; WINK, M. Identification and biological activities of triterpenoid saponins from *Chenopodium quinoa*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n. 5, p. 2327-32, 2001.

WU, Z.; TUCKER, I. G.; RAZZAK, M.; MEDLICOTT, N. J. An in vitro kinetic method for detection of precipitation of poorly soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 304, n. 1-2, p. 1-3, 2005.

YIN, Z.; XU, J.; LUO, D. A meta-analysis comparing long-term recurrences of toenail onychomycosis after successful treatment with terbinafine versus itraconazole. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 23, n. 6, p. 449-52, 2012.

ZHU, N.; SHENG, S.; SANG, S.; JHOO, J. W.; BAI, N.; KARWE, M. V.; et al. Triterpene saponins from debittered quinoa (*Chenopodium quinoa*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n.4, p. 865-7, 2002.

ZHU, W.; ROMANSKI, F. S.; DALVI, S. V.; DAVE, R. N.; TOMASSONE S. M. Atomistic simulations of aqueous griseofulvin crystals in the presence of individual and multiple additives. **Chemical Engineering Science**, v. 73, n. 0, p. 218-230, 2012.