



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

TIAGO DEIVISON PEREIRA LOPES

**POTENCIAL ANTIDERMATOFÍTICO DE *Mo*-CBP₄, UMA PROTEÍNA
LIGANTE À QUITINA DE SEMENTES DE *Moringa oleifera***

FORTALEZA – CEARÁ

2016

TIAGO DEIVESON PEREIRA LOPES

POTENCIAL ANTIDERMATOFÍTICO DE *Mo*-CBP₄, UMA PROTEÍNA LIGANTE À
QUITINA DE SEMENTES DE *Moringa oleifera*

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito para obtenção do título de mestre em Bioquímica.

Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Orientadora: Prof^a. Dra. Ilka Maria Vasconcelos

FORTALEZA – CEARÁ

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- L856p Lopes, Tiago Deiveson Pereira.
 Potencial antidermatofítico de Mo-CBP4, uma proteína ligante à quitina de sementes de
 Moringa oleifera / Tiago Deiveson Pereira Lopes. – 2016.
 105 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa
 de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2016.
 Orientação: Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos.
1. Dermatofitoses. 2. Moringa oleifera. 3. Proteína ligante à quitina. 4. Potencial
 antidermatofítico. I. Título.

CDD 572

TIAGO DEIVESON PEREIRA LOPES

POTENCIAL ANTIDERMATOFÍTICO DE *Mo*-CBP₄, UMA PROTEÍNA LIGANTE À
QUITINA DE SEMENTES DE *Moringa oleifera*

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito para obtenção do título de mestre em Bioquímica.

Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Orientadora: Prof^a. Dra. Ilka Maria Vasconcelos

Aprovada em: 17 de março de 2016.

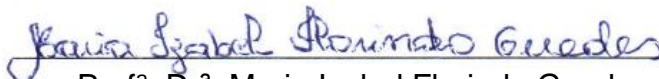
BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Ilka Maria Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará (Orientadora)



Prof^a. Dr^a. Nylane Maria Nunes de Alencar
Universidade Federal do Ceará



Prof^a. Dr^a. Maria Izabel Florindo Guedes
Universidade Estadual do Ceará

Ao meu Deus.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, por ter me dado o dom da vida, saúde, força e disposição para superar todos os obstáculos. Além de ter direcionado meus passos e me proporcionado a oportunidade de trabalhar com pessoas tão maravilhosas.

À Professora Dr.^a Ilka Maria Vasconcelos, minha querida orientadora e mãe científica, um grande exemplo de pessoa e profissional, a qual devo a realização desse trabalho e um grande aprendizado adquirido. Agradeço pela paciência e compreensão de sempre e por todos as preocupações, cuidados, conselhos e ensinamentos. Meus mais sinceros agradecimentos!

À Dr.^a Mirella Leite Pereira, minha “grande” co-orientadora “Mi”, uma pessoa que sempre está disposta a ajudar e que sabe o real significado da orientação. Agradeço pela enorme ajuda e contribuição que foram essenciais para o desenvolvimento desse trabalho. Obrigado pelos elogios e também pelas broncas que vieram sempre nos momentos certos. Sou muito grato pela motivação que você sempre me passou e por sempre acreditar em meu potencial.

Às professoras Dr.^a Maria Izabel e Dr.^a Nylane por terem aceitado tão prontamente participarem da banca examinadora.

À Professora Dr.^a Daniele de Sousa, “Dani”, agradeço pela grande ajuda na realização desse trabalho, pela disposição em ajudar sempre que precisei. Além dos alegres e descontraídos momentos que sempre nos proporciona.

Ao Professor José Tadeu por todos os conselhos e ensinamentos. Pelo excelente exemplo de pessoa, professor e pesquisador.

Aos meus amigos da família Labtox. À Clidia Eduarda por ter sido o meu primeiro contato no laboratório, isso foi muito importante em minha adaptação. À minha “instrutora” Helen Paula, pela essencial e indiscutível ajuda em meu aprendizado nos experimentos, por nunca ter negado uma ajuda sequer, pelos momentos de descontração e pela amizade sincera. Serei eternamente grato! Ao meu colega de bancada João Xavier (Xampes) pela contribuição na execução dos experimentos, por ter me ajudado muito na purificação. Obrigado pela amizade e pelos momentos de risadas! Ao meu grande amigo irmão Paulo Carvalho pela contribuição nesse trabalho, pelo apoio, motivação e pela sempre pronta ajuda. Agradeço por tornar o ambiente de trabalho mais descontraído e pela amizade sincera! Àqueles que

apesar de não terem participado diretamente desse trabalho, foram fundamentais para minha adaptação e para tornar o ambiente de trabalho mais agradável: Ana Paula, Dhion, Marina, Lucas, Tarcymara, Mariana, Lady, Bella, Nadine, Yara, Amanda e Felipe.

Aos meus amigos de graduação Wallace Teixeira e Adson Ávila que me acompanham nessa carreira de Bioquímico até aqui.

Aos meus amigos de departamento Thiago Fernandes, Pedro Filho, Handerson, Vilmara e Emanuel por tornarem os dias de trabalho mais descontraídos.

A todos os professores e funcionários que fazem parte do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC.

À minha família que é a minha base. Com muito amor e carinho, aos meus pais Carlos e Aurineide que sempre me deram o carinho e o amor necessários, o apoio para a realização dos meus sonhos e acima de tudo foram determinantes para o desenvolvimento de minha maturidade e formação do meu caráter. Amo muito vocês!

Aos meus irmãos David, Priscila, Débora e Jonathan pelas experiências que tivemos juntos e por sempre terem acreditado em meu potencial e torcido pelo meu sucesso. Aos meus primos irmãos Fernanda e Matheus pela torcida de sempre.

Ao amor da minha vida, minha namorada Michelly, por todo amor e atenção sempre que preciso e pela paciência e compreensão nos momentos de tensão. Obrigado por sua dedicação e cumplicidade. Te amo muito!

Ao meu avô José Sival, que nos deixou durante o desenvolvimento desse trabalho. Por ter sido sempre tão carinhoso comigo e um exemplo de homem batalhador.

Aos meus demais familiares, por todo o apoio durante toda a minha vida até aqui.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Os procedimentos experimentais que compõem esta dissertação foram realizados com o apoio das seguintes instituições:

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - através das atividades de capacitação no ensino e pesquisa em Bioquímica desenvolvidos pelo Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e realizadas em parceria com o **Laboratório de Toxinas Vegetais- LABTOX**, sob coordenação e orientação da Dra. Ilka Maria Vasconcelos.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ – Laboratório de Patógenos Emergentes e Reemergentes – LAPERE, sob coordenação da Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, pela concessão das cepas fúngicas utilizadas neste trabalho.

CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPq) - através da concessão de bolsa de Pós-Graduação ao autor deste trabalho.

DEMAIS INSTITUIÇÕES DE FOMENTO E APOIO À PESQUISA COMO: CAPES e FUNCAP que contribuem para a melhoria nas condições experimentais e na formação de recursos humanos dentro do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da UFC.

“O caminho do progresso não é rápido e nem fácil. ”

Marie Curie

RESUMO

As dermatofitoses são consideradas um problema de saúde pública, afetando cerca de 25% da população mundial. Vários medicamentos estão disponíveis no mercado para tratar dermatofitoses, porém essas drogas trazem muitos efeitos adversos, incluindo elevada toxicidade, interações medicamentosas, pouca eficácia e desenvolvimento de resistência. Assim, a busca por novas drogas mais seguras e eficazes é imperativa. As plantas medicinais constituem uma valiosa fonte de produtos naturais capazes de atuar como fármacos, caracterizando-se como uma alternativa aos tratamentos convencionais. *Moringa oleifera* Lamarck, uma planta originária do Norte da Índia, é bastante utilizada por suas propriedades nutricionais, purificadora de água e terapêuticas. Diante disso, esse trabalho objetivou avaliar o potencial antidermatofítico de *Mo-CBP₄*, uma proteína ligante à quitina, purificada de sementes de *M. oleifera*. Através de ensaios *in vitro*, *Mo-CBP₄* apresentou atividade inibitória frente ao fungo *Trichophyton mentagrophytes*, apresentando um CIM₅₀ de 500 µg/mL. Contrariamente, *Mo-CBP₄* não inibiu o fungo *T. rubrum*, mesmo em uma concentração mais elevada (1000 µg/mL). *Mo-CBP₄* (500 µg/mL) foi capaz de inibir a germinação de conídios de *T. mentagrophytes*, mas não o crescimento micelial. Em relação ao modo de ação, a atividade antifúngica de *Mo-CBP₄* não parece envolver o sítio de interação a carboidrato desde que mesmo incubada com *N*-acetil-D-glucosamina 0,15 M permaneceu ativa. A atividade antifúngica de *Mo-CBP₄* parece resultar do aumento da permeabilidade da membrana dos conídios e indução de estresse oxidativo no interior das células, causado pela proteína. Atividade antifúngica de *Mo-CBP₄* contra *T. mentagrophytes* foi também verificada em ensaio *in vivo*. Em modelo de dermatofitose animal, utilizando camundongos albinos Swiss fêmeas, o hidrogel contendo *Mo-CBP₄* (5 e 10 mg/g) se mostrou eficaz no tratamento da infecção causada por *T. mentagrophytes*, diminuindo a gravidade das lesões e abreviando o tempo de infecção. Os dados obtidos indicam que *Mo-CBP₄* tem potencial para o desenvolvimento de uma nova droga antifúngica a ser utilizada no tratamento de dermatofitose causada por *T. mentagrophytes*.

Palavras-chave: Dermatofitoses; *Moringa oleifera*; proteína ligante à quitina; potencial antidermatofítico.

ABSTRACT

Dermatophytosis constitute an important public health problem, affecting about 25% of world population. Several drugs are available for the dermatophytosis treatment, but they cause many adverse effects, including severe toxicity, drug interactions, low efficacy and resistance. Thus, there is a need for the development of new drugs with improved efficacy and safety. Medicinal plants are a valuable source of natural products that can act as drugs, being an alternative to conventional treatments. *Moringa oleifera* Lamarck, a plant native from Northeast of India, is widely used for its nutritional, therapeutic and water purification properties. Thus, this study aimed to evaluate the antidermatophytic potential of *Mo*-CBP₄, a chitin-binding protein purified from *M. oleifera* seeds. By *in vitro* assays, *Mo*-CBP₄ showed inhibitory activity against the fungus *Trichophyton mentagrophytes*, with a MIC₅₀ of 500 µg/mL. In contrast, *Mo*-CBP₄ did not inhibit the fungus *T. rubrum*, even at a higher concentration (1000 µg/mL). *Mo*-CBP₄ (500 µg/mL) was able to inhibit the conidia germination of *T. mentagrophytes*, but not the mycelial growth. In relation to the mode of action, the antifungal activity of *Mo*-CBP₄ does not seem to involve the carbohydrate interaction site since the protein remained active even when incubated with 0.15 M *N*-acetyl-D-glucosamine. The antifungal activity of *Mo*-CBP₄ appears to result from the increased permeability of the conidia cell membrane and induction of oxidative stress within the cell, cause by this protein. *Mo*-CBP₄ also showed antifungal activity against *T. mentagrophytes* by *in vivo* assays. In dermatophytosis model using albino Swiss female mice the hydrogel containing *Mo*-CBP₄ (5 and 10 mg/g) was effective, reducing the lesion severity and shortening the infection period. The findings indicate that *Mo*-CBP₄ has potential for development of a novel antifungal drug for clinical treatment of dermatophytosis caused by the fungus *T. mentagrophytes*.

Keywords: Dermatophytosis; *Moringa oleifera*; chitin-binding protein; antidermatophytic potential.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Anatomia da pele	27
Figura 2 -	Representação esquemática da estrutura da parede celular dos dermatófitos	28
Figura 3 -	Aspectos clínicos das dermatofitoses	34
Figura 4 -	Esquema geral de purificação da <i>Mo</i> -CBP ₄ a partir de farinha delipidada de sementes de <i>M. oleifera</i>	51
Figura 5 -	Perfis das cromatografias de afinidade e troca iônica para obtenção de <i>Mo</i> -CBP ₄	63
Figura 6 -	Teste de susceptibilidade <i>in vitro</i> dos fungos <i>T. mentagrophytes</i> e <i>T. rubrum</i> à ação da <i>Mo</i> -CBP ₄	65
Figura 7 -	Avaliação do efeito de <i>Mo</i> -CBP ₄ sobre o crescimento micelial do fungo dermatófito <i>T. mentagrophytes</i>	67
Figura 8 -	Avaliação do efeito de <i>Mo</i> -CBP ₄ sobre a germinação dos conídios do fungo dermatófito <i>T. mentagrophytes</i>	69
Figura 9 -	Ensaio de inibição da germinação dos conídios do fungo dermatófito <i>T. mentagrophytes</i> na presença de <i>Mo</i> -CBP ₄ incubada previamente ou não com o carboidrato N-acetil-D-glucosamina (NAG)	70
Figura 10 -	Efeito de <i>Mo</i> -CBP ₄ na indução de espécies reativas de oxigênio (EROs) em conídios do dermatófito <i>T. mentagrophytes</i>	71
Figura 11 -	Efeito de <i>Mo</i> -CBP ₄ sobre a permeabilidade da membrana de conídios do dermatófito <i>T. mentagrophytes</i>	73
Figura 12 -	Curso da infecção causada por <i>T. mentagrophytes</i> em modelo de dermatofitose <i>in vivo</i> em camundongos	74

- Figura 13 - Curso da infecção causada por *T. mentagrophytes* em camundongos tratados com *Mo*-CBP₄ em diferentes doses 77
- Figura 14 - Imagens das lesões causadas pelo fungo dermatófito *T. mentagrophytes* em pele de camundongos submetidos ou não ao tratamento com *Mo*-CBP₄, obtidas em diferentes dias 79
- Figura 15 - Fragmentos de tecidos lesionados de camundongos infectados com *T. mentagrophytes* cultivados em meio ágar batata dextrose 80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Etapas de purificação da <i>Mo</i> -CBP ₄ , com os respectivos teores e rendimentos proteicos	62
Tabela 2 -	Valores do CIM ₅₀ e CIM ₉₀ de <i>Mo</i> -CBP ₄ e do antifúngico griseofulvina frente ao fungo <i>T. mentagrophytes</i>	66
Tabela 3 -	Eficácia clínica do tratamento com a aplicação tópica de <i>Mo</i> -CBP ₄ em diferentes concentrações	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	ATP-binding cassette
Abs	Absorbância
ANOVA	Analysis of Variance
BDA	Ágar Batata Dextrose
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BSA	Bovine Serum Albumin
CEPA	Comitê de Ética de Pesquisa com Animais
CIM	Concentração Inibitória Mínima
ClaveLL	<i>Cladonia verticillaris</i> lichen lectin
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CM	Carboximetil
CSF	Colony-Stimulating Factor
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GlcNac	N-acetil-D-glucosamina
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-3	Interleucina 3
IL-6	Interleucina 6
IL-7	Interleucina 7
IL-8	Interleucina 8
IP	Iodeto de Propídio
MHC	Major Histocompatibility Complex
Mo-CBP	<i>Moringa oleifera</i> – Chitin Binding Protein
NAG	N-acetil-D-glucosamina
PAC	Pico eluído com ácido acético
Pf-Alb	<i>Passiflora edulis f. flavicarpa</i> Albumin
RsAFP2	<i>Raphanus sativus</i> Antifungal Peptide 2
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
TGF- α	Transforming Growth Factor alpha

TGF- β	Transforming Growth Factor beta
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha
<i>TruMDR1</i>	<i>Trichophyton rubrum</i> multidrug resistance 1
<i>TruMDR2</i>	<i>Trichophyton rubrum</i> multidrug resistance 2

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1	INTRODUÇÃO	19
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
2.1	Dermatófitos	22
2.2	Dermatofitoses	25
2.2.1	<i>Patogênese</i>	25
2.2.2	<i>Aspectos clínicos</i>	30
2.2.3	<i>Epidemiologia</i>	33
2.2.4	<i>Tratamento</i>	35
2.2.5	<i>Resistência aos antifúngicos</i>	37
2.3	Plantas medicinais	39
2.3.1	<i>Moringa oleifera LAMARCK</i>	40
2.3.2	<i>Mo-CBP₄ (Moringa oleifera-Chitin Binding Protein)</i>	42
2.3.2.1	<i>Atividade anti-inflamatória e antinociceptiva</i>	43
3	HIPÓTESE	45
4	OBJETIVOS	46
4.1	Objetivo Geral	46
4.2	Objetivos Específicos	46

5	MATERIAIS	47
5.1	Materiais biológicos	47
5.1.1	<i>Sementes</i>	47
5.1.2	<i>Fungos dermatófitos</i>	47
5.1.3	<i>Animais</i>	47
5.2	Reagentes químicos e outros materiais	48
6	MÉTODOS	49
6.1	Obtenção de <i>Mo</i>-CBP₄	49
6.1.1	<i>Determinação do teor de proteínas</i>	50
6.2	Avaliação da atividade antidermatofítica <i>in vitro</i> de <i>Mo</i>-CBP₄	50
6.2.1	<i>Procedimentos gerais dos ensaios antifúngicos</i>	50
6.2.2	<i>Teste de susceptibilidade dos fungos in vitro</i>	52
6.2.3	<i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM₅₀ e CIM₉₀)</i>	53
6.2.4	<i>Ensaio de inibição do crescimento micelial</i>	53
6.2.5	<i>Ensaio de inibição da germinação</i>	54
6.2.6	<i>Ensaio de avaliação do modo de ação</i>	55
6.2.6.1	<i>Ensaio de inibição da germinação na presença de N-acetil-D-glucosamina (NAG)</i>	55
6.2.6.2	<i>Avaliação da indução da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)</i>	55

6.2.6.3	<i>Avaliação sobre a permeabilidade da membrana do microconídio</i>	56
6.3	Avaliação da atividade antidermatofítica <i>in vivo</i> de <i>Mo</i>-CBP₄	56
6.3.1	<i>Procedimentos gerais do ensaio antifúngico em modelo animal</i>	56
6.3.1.1	<i>Preparação do inóculo</i>	56
6.3.1.2	<i>Preparação das amostras</i>	57
6.3.2	<i>Modelo de infecção em camundongos</i>	57
6.3.3	<i>Desenho experimental</i>	59
6.3.4	<i>Estudo da cultura com amostras de tecidos da pele infectados</i>	59
6.4	Análise estatística	60
7	RESULTADOS	61
7.1	Obtenção de <i>Mo</i>-CBP₄	61
7.2	Atividade antidermatofítica <i>in vitro</i> de <i>Mo</i>-CBP₄	64
7.2.1	<i>Susceptibilidade dos dermatófitos in vitro</i>	64
7.2.2	<i>Concentração Inibitória Mínima (CIM₅₀ e CIM₉₀)</i>	64
7.2.3	<i>Inibição do crescimento micelial</i>	64
7.2.4	<i>Inibição da germinação</i>	68
7.2.5	<i>Avaliação do modo de ação</i>	68
7.3	Avaliação da atividade antidermatofítica <i>in vivo</i> de <i>Mo</i>-CBP₄	72
8	DISCUSSÃO	81

9	CONCLUSÃO	92
	REFERÊNCIAS	93

1 INTRODUÇÃO

As dermatofitoses estão entre as doenças infecciosas humanas mais comuns na população mundial e são caracterizadas pela invasão do extrato queratinizado da pele e de seus anexos por fungos dermatófitos que estão distribuídos em três gêneros, *Trichophyton*, *Epidermophyton* e *Microsporum* (RIVERA; LOSADA; NIERMAN, 2012). Esses fungos, geralmente, são encontrados em camadas superiores de células da pele em áreas úmidas do corpo, podendo causar desde uma simples irritação até infecções mais sérias, com a ocorrência de inchaço, descamação, formação de bolhas e erupções na pele (CHUANG *et al.*, 2007). Comumente, essas infecções são conhecidas como tineas ou micoses e podem ser uma consequência da ação direta dos dermatófitos ou da reação inflamatória do hospedeiro aos materiais produzidos pelos fungos durante o processo de invasão (PERES *et al.*, 2010; KARIMI; MIKAEILI, 2013).

Vários estudos epidemiológicos apontam as dermatofitoses como sério problema de saúde pública, principalmente em regiões tropicais, onde persiste clima quente e úmido, que são as condições climáticas favoráveis para a implantação dessas infecções (HAVLICKOVA; CZAICA; FRIEDRICH, 2008; BADALI *et al.*, 2015). Além das condições do clima, outros fatores de risco também têm contribuído para o aumento da incidência das dermatofitoses, tais como a utilização sem precedentes de antibióticos e drogas imunossupressoras e o aumento da incidência nos casos de diabetes *mellitus* e da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012; PIRACCINI; ALESSANDRINI, 2015). As dermatofitoses afetam cerca de 25% da população humana mundial, estando as espécies *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* entre os agentes etiológicos causadores mais frequentes (LAKSHMIPATHY; KANNABIRAN, 2010; MEI *et al.*, 2015).

No mundo, sempre foram enormes os gastos por ano no desenvolvimento de drogas para o tratamento de dermatofitoses (GRÄSER; SCOTT; SUMMERBELL, 2008). Entretanto, apesar desse desenvolvimento de novos tratamentos e terapias antifúngicas, as infecções causadas pelos dermatófitos são muito difíceis de serem erradicadas completamente, com recorrência relatada entre 25 e 40% dos casos

(SHARMA; KUMAR; JOSHI, 2011). Um largo número de agentes antifúngicos, tais como griseofulvina, derivados azólicos e alilaminas, é usado no tratamento dessas infecções. Entretanto, essas drogas trazem vários efeitos adversos, incluindo toxicidade ao homem e organismos não alvos, interações medicamentosas e pouca eficácia. Dentre os efeitos tóxicos ao homem, podem ser citados distúrbios gastrointestinais, reações cutâneas, hepatotoxicidade e leucopenia (KALAIVANAN; CHANDRASEKARAN; VENKATESALU, 2013). Além disso, apresentam limitado número de alvos celulares e, frequentemente, estão associados à seleção ou surgimento de linhagens fúngicas mais resistentes (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008). Portanto, a descoberta de novos agentes antifúngicos é de grande importância.

Por muitos séculos, as plantas medicinais têm sido fonte de uma grande variedade de compostos biologicamente ativos usados no tratamento de várias doenças (BORRIS, 1996). Dentre esses compostos, como possíveis portadores de potencial antifúngico, estão as proteínas, que podem ser utilizadas de modo a substituir ou minimizar o uso massivo de fungicidas sintéticos, além de proporcionar o desenvolvimento de alternativas para o controle de fungos patogênicos, com base em compostos naturais, aos quais esses organismos não estão adaptados. Tais proteínas foram desenvolvidas pelas plantas, ao longo da evolução, como estratégias naturais de defesa (VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004; LEE *et al.*, 2008; TATSADJIEU *et al.*, 2009). Nos últimos anos, os estudos têm sido crescentes nessa área e é cada vez maior o número de relatos da presença de proteínas tóxicas em diversas espécies vegetais, demonstrando o possível uso biotecnológico dessas moléculas no tratamento de doenças causadas por fungos patogênicos.

Seguindo essa tendência, *Moringa oleifera* Lamarck, uma espécie originária do norte da Índia, é bastante utilizada pelo seu valor medicinal. Várias partes da planta, incluindo as raízes, cascas, vagens e folhas, têm sido utilizadas pela medicina tradicional no tratamento de doenças humanas. Alguns estudos descrevem essa espécie como um potente anti-inflamatório, hepatoprotetor, anti-hipertensivo, anti-tumoral e antimicrobiano (EILERT; WOLTERS; NAHRSTEDT, 1981; FAIZI *et al.*, 1995; EZEAMUZLE *et al.*, 1996; MURAKAMI *et al.*, 1998; PARI; KUMAR, 2002). Em relação às propriedades antimicrobianas, destaca-se a atividade antifúngica, que tem

sido alvo de muitas pesquisas. Recentemente, nosso grupo de pesquisa purificou uma proteína ligante à quitina de sementes de *M. oleifera*, denominada *Mo-CBP₃* (*Mo*: *M. oleifera*, *CBP*: “Chitin Binding Protein” e a numeração indica a ordem de eluição da proteína na matriz CM-Sepharose), que apresentou atividade contra várias espécies de fungos fitopatogênicos, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum musae* e *Colletotrichum gloesporioides*. A proteína apresentou atividade fungistática ou fungicida, dependendo da concentração utilizada (GIFONI *et al.*, 2012). No entanto, também há outros relatos de atividade da *M. oleifera* contra fungos patogênicos ao homem. Há exemplos que relatam o uso do extrato etanólico de sementes e folhas de *M. oleifera* contra espécies de fungos patogênicos ao homem como *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis* e *Candida albicans* (CHUANG *et al.*, 2007; TALREJA, 2010).

Além de *Mo-CBP₃*, nosso grupo de pesquisa também conseguiu purificar uma segunda proteína ligante à quitina das sementes de *M. oleifera*, denominada *Mo-CBP₄*, ambas apresentando propriedades bioquímicas semelhantes. *Mo-CBP₄* apresentou potentes atividades antinociceptiva e anti-inflamatória, quando administrada em camundongos via intraperitoneal e oral (PEREIRA *et al.*, 2011). Diante disso, apesar de já ser conhecida a atividade antifúngica de *Mo-CBP₃*, considerando que *Mo-CBP₄* apresenta as importantes atividades acima relatadas por via intraperitoneal e oral, e acreditando na permanência dessas atividades em seu uso tópico, essa pareceu ser mais indicada para um futuro tratamento de infecções e, assim, foi escolhida como objeto de estudo no presente trabalho, visando responder ao seguinte questionamento:

“*Mo-CBP₄*, uma proteína ligante à quitina purificada de sementes de *M. oleifera*, seria ativa contra dermatófitos, mostrando eficácia no tratamento de dermatofitoses? ”

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Dermatófitos

Os dermatófitos são definidos como um grupo de fungos que possuem a habilidade de invadir e se propagar em tecidos queratinizados, como a pele, cabelo e unhas do homem e de outros animais, causando infecções contagiosas. A infecção é geralmente cutânea e restrita às camadas superficiais dos tecidos, podendo, raramente, em hospedeiros imunocomprometidos, disseminar-se em camadas mais profundas da pele e de outros órgãos (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995).

Essa capacidade de infecção aos tecidos queratinizados está relacionada com o fato dos dermatófitos serem queratinofílicos e queratinolíticos. Esses termos referem-se ao potencial desses fungos de degradar a queratina e utilizá-la como substrato fornecedor dos nutrientes necessários para o seu crescimento e desenvolvimento. A degradação ocorre por meio de enzimas do tipo queratinases, que são produzidas durante a infecção (ELEWSKI, 1998; ONIFADE *et al.*, 1998; MARTINEZ *et al.*, 2012).

Atualmente, os dermatófitos estão inseridos na família Arthrodermataceae, um grupo monofilético de fungos filamentosos, e são pertencentes à ordem Onygenales e à classe Eurotiomycetes (ILKIT; DURDU, 2015). Como os gêneros anamórficos são os agentes mais comuns das dermatofitoses, pois são os esporos resultantes de reprodução assexuada, os artroconídios, a causa primária dessas infecções, geralmente são esses os fungos mais enfatizados (GUPTA *et al.*, 2003). A seguir, estão as principais características que os distinguem (DIEGO, 2011):

- a) Gênero *Epidermophyton*: Duas espécies apenas são descritas para esse gênero, sendo que a espécie *Epidermophyton floccosum* é a única patogênica ao homem, constituindo a representante do gênero. Exibem como características microscópicas a presença de numerosos macroconídios claviformes com a parede geralmente lisa e moderadamente espessa, as extremidades arredondadas e a presença de 1 a 9 septos. Entretanto, não apresentam microconídios. Como

características macroscópicas, apresentam colônias visíveis depois de um período de incubação entre 7 e 9 dias. Estas exibem aspecto aveludado, pulverulento e de cor amarelo esverdeado;

- b) Gênero *Microsporum*: Possui aproximadamente 20 espécies distintas descritas, das quais cerca de 10 são patogênicas ao homem, sendo o *Microsporum audouinii* a espécie tipo. Do ponto de vista microscópico, essas espécies apresentam abundantes macroconídios com parede celular podendo ser lisa, rugosa ou espiculada e variando em diferentes níveis de espessura, fina, intermediária ou grossa. Geralmente, esses macroconídios exibem as extremidades pontiagudas, fusiformes ou arredondadas, podendo apresentar de 1 a 15 septos. Os microconídios são sésseis ou pedunculados e normalmente se encontram distantes das hifas ou em racimos. As características macroscópicas das colônias são bastante variadas entre as espécies, podendo ser algodonosas, terrosas, pulverulentas e de cor amarelo alaranjado;
- c) Gênero *Trichophyton*: É o que mais possui espécies relacionadas com dermatofitoses no homem. Dentre as 30 espécies aproximadamente descritas para o gênero, cerca de 10 são patogênicas ao homem, sendo o representante o *Trichophyton tonsurans*. Microscopicamente, apresentam um número escasso de macroconídios charutoides, fusiformes ou cilíndricos, exibindo uma parede fina e lisa e de 1 a 12 septos. Os microconídios são geralmente mais numerosos, possuindo forma globosa, piriforme ou alargada, podendo ser sésseis ou pedunculados. Macroscopicamente, as espécies deste gênero são bastante diferenciadas, as colônias podem exibir aspecto pulverulento, algodonosos, veludosos, etc. O reverso pode apresentar uma pigmentação avermelhada ou marrom.

Além da classificação baseada nos critérios morfológicos, os dermatófitos são também classificados com base nos *habitats* primários com os quais estão

associados, sendo divididos em três grupos ecológicos: geofílicos, zoofílicos e antropofílicos. Provavelmente, alguns desses fungos patogênicos evoluíram de seu ambiente natural no solo e adquiriram especificidade por hospedeiro, resultando nesses três grupos ecológicos (AJELLO, 1962; WHITE *et al.*, 2008; HAYETTE; SACHELI, 2015).

Os dermatófitos geofílicos apresentam-se como saprófitas no solo e possuem a capacidade de colonizar competitivamente substratos queratinosos em decomposição. Além da questão da disponibilidade da queratina, outro fator que influencia a distribuição desses fungos é o pH do solo, os quais possuem um pH ótimo próximo do neutro. Algumas poucas espécies causam micoses em animais e no homem, pois esses tipos de fungos são geralmente encontrados diretamente no solo sob a forma de um elevado número de esporos e raramente são transmitidos do homem para o homem ou de pequenos animais para o homem. Um exemplo de dermatófito geofílico bastante conhecido é o *Microsporum gypseum*, uma espécie patogênica ao homem e animais (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; SIMPANYA, 2000; WHITE *et al.*, 2008).

Diferentemente dos fungos geofílicos, os zoofílicos dificilmente crescem como saprófitas no solo, mas conseguem sobreviver em estado de dormência em materiais de origem animal. Estes são geralmente patógenos de animais, possuindo um hospedeiro específico ou um número bem limitado. Algumas espécies, como *Microsporum canis*, *Trichophyton verrucosum* e *T. mentagrophytes*, são frequentemente associadas como causadoras de dermatofitoses em animais; entretanto, não raramente causam infecções também no homem. *M. canis* é a espécie de dermatófito zoofílico melhor documentada, comumente infectando cães e gatos, que são um dos maiores responsáveis por transmitir a infecção ao homem.

As espécies de dermatófitos antropofílicos são as mais adaptadas ao homem, causando respostas inflamatórias bem menores no hospedeiro do que aquelas causadas pelos fungos geofílicos e zoofílicos e, como sua transmissão ocorre através do contato direto entre humanos, estão associadas à vida em comunidade, por exemplo, sua propagação é muito comum em escola, quartel, prisão e outros lugares onde a concentração de pessoas é grande. Essa transmissão decorre da dispersão de propágulos infecciosos, que são originados das lesões produzidas por

estes fungos, e que pode ocorrer por meio do compartilhamento de objetos individuais como roupas e toalhas. Dentre as espécies antropofílicas mais conhecidas estão o *T. mentagrophytes* e o *T. rubrum*, esta última possuindo distribuição global e acometendo todas as populações e grupos étnicos, principalmente aqueles de países em desenvolvimento (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; SIMPANYA, 2000).

2.2 Dermatofitoses

O termo dermatofitose refere-se às infecções em tecidos e estruturas queratinizadas, tais como unhas, cabelos e estrato córneo da pele, causadas pelos fungos dermatófitos que, apesar de não comporem a flora normal da pele humana, são bem adaptados a esses tecidos, pois utilizam a queratina como fonte de nutrientes (WAGNER; SOHNLE, 1995; SMIJS; PAVEL, 2011).

As dermatofitoses podem ser transmitidas pelo contato direto com animais e homem ou pelo contato indireto através de fômites contaminadas. Os aspectos clínicos apresentam-se de forma bastante variada, dependendo da espécie do fungo, sítio anatômico acometido pela infecção e resposta inflamatória do hospedeiro. As lesões causadas na pele podem apresentar-se como consequências da ação direta dos dermatófitos ou de respostas do sistema imunológico do hospedeiro a esses microrganismos ou produtos metabólicos por eles produzidos. Essas lesões são bem típicas, apresentando aspectos circulares, eritematosos e pruriginosos. Geralmente, as infecções são restritas à epiderme superficial; entretanto, em hospedeiros imunocomprometidos, pode ocorrer invasão de tecidos subcutâneos ou órgãos internos (PERES *et al.*, 2010).

2.2.1 Patogênese

A patogênese das dermatofitoses está intimamente ligada à interação entre hospedeiro-dermatófito. Para que o processo infeccioso ocorra, os dermatófitos precisam vencer os mecanismos de defesa inatos do hospedeiro como a epiderme. Esta, além de ser uma barreira passiva à entrada de organismos infecciosos, atua

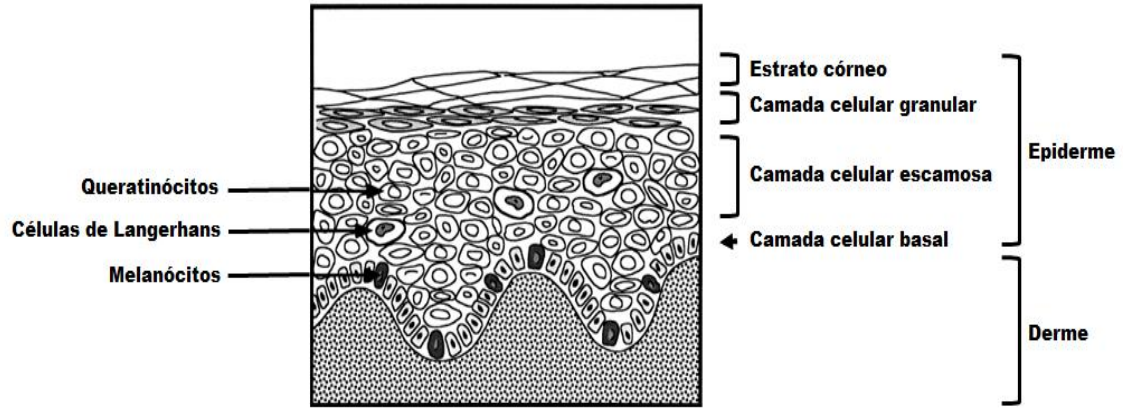
também como um órgão imunológico, compondo o importante e complexo sistema imune cutâneo (WAGNER; SOHNLE, 1995).

Além das características que dificultam o crescimento do fungo, em decorrência de sua própria localização anatômica, como alta exposição à luz ultravioleta, baixas condições de umidade e competição com a microbiota normal, a pele também apresenta uma estrutura física e química (FIGURA 1) que dificulta a entrada desses microrganismos. Uma das principais camadas da estrutura física da pele que exerce essa função de proteção é o estrato córneo, que é formado por queratina. Apesar dos dermatófitos produzirem enzimas que degradam a queratina que facilita a entrada no estrato córneo, a infecção é dificultada pela constante renovação dessa camada, pois remove o fungo, processo denominado de queratinização. Portanto, para que a invasão ocorra, o artroconídio deve aderir ao tecido, germinar e penetrar rapidamente (WAGNER; SOHNLE, 1995; PERES *et al.*, 2010).

Nesse processo de infecção, a parede celular desempenha uma função muito importante na adesão do patógeno e, provavelmente, está associada com o seu nível de virulência. A camada mais externa da parede celular (FIGURA 2) é constituída por β -glucanos, compostos de unidades de α -glucopiranosose com predomínio de ligações β -1,3 e β -1,6. A segunda camada é formada por galactomananas, um complexo glicoproteico consistindo de α -manopiranosose, manofuranose e galactofuranose ligado a um esqueleto peptídico. A terceira camada é composta por quitina, um polímero de *N*-acetil-D-glucosamina unidas por ligações β -1,4 (SMIJS; PAVEL, 2011).

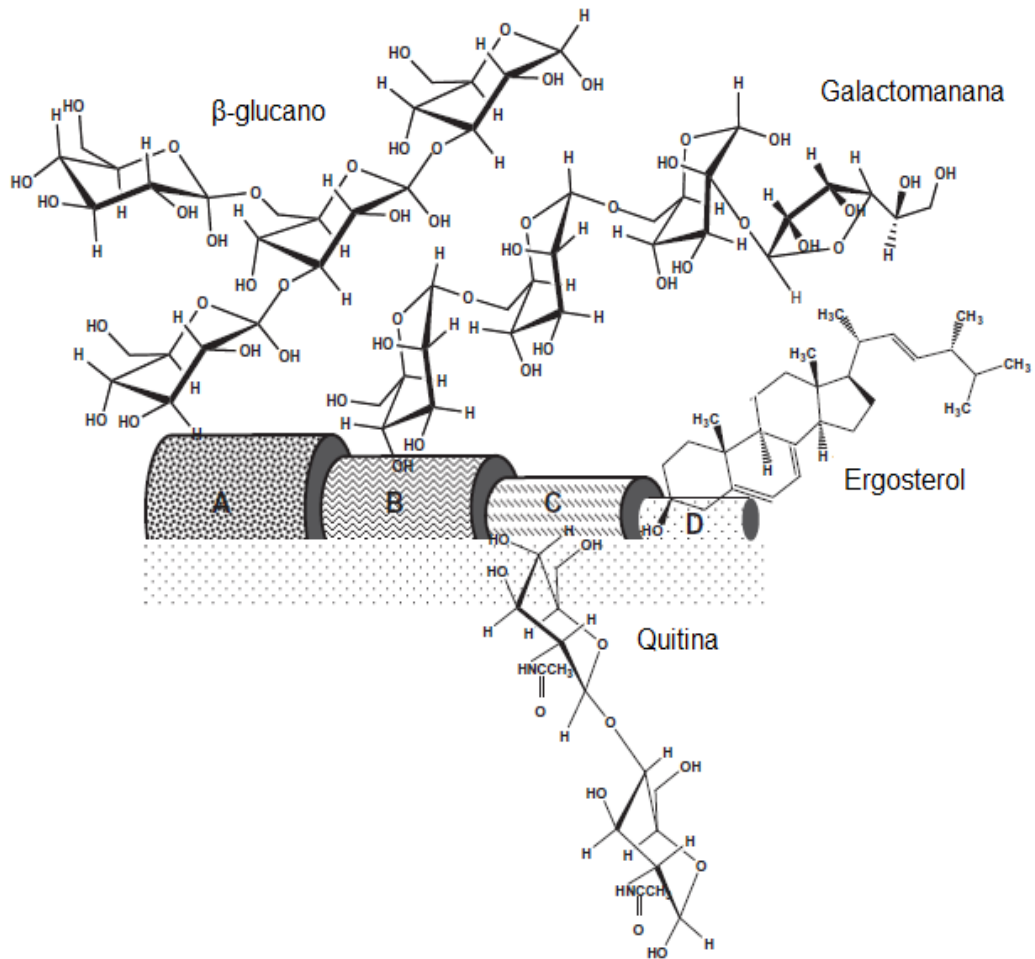
Na patogênese da dermatofitose, a aderência máxima do artroconídio de *Trichophyton* spp. aos queratinócitos da camada córnea ocorre de 3 a 4 horas depois do primeiro contato. Em *T. mentagrophytes*, a aderência máxima ocorre com 12 horas, a germinação tem início com 24 horas e a penetração no estrato córneo com 3 dias depois (ZURITA; HAY, 1987; DUEK *et al.*, 2004). Durante o processo de adesão dos artroconídios de *T. mentagrophytes* ao estrato córneo, ocorre a formação de estruturas fibrilares que ancoram o artroconídio à superfície do tecido e ainda possibilitam a ligação entre artroconídios adjacentes. Isso contribui com o aumento da superfície de contato, proporcionando maior adesão e com isso maior aquisição de

Figura 1 – Anatomia da pele



Fonte: WAGNER; SOHNLE, 1995.

Figura 2 – Representação esquemática da estrutura da parede celular dos dermatófitos



Fonte: SMIJS; PAVEL, 2011.

(A) camada mais externa formada por β -glucano. (B) camada intermediária formada por galactomananas. (C) camada mais interna formada por quitina. (D) membrana celular formada por ergosterol.

nutrientes. Além da formação dessas estruturas fibrilares, está também envolvida no processo de adesão a existência de adesinas carboidrato-específicas na superfície do artroconídio, que reconhecem e se ligam aos resíduos de manose e galactose da superfície celular (ESQUENAZI *et al.*, 2004; KAUFMAN *et al.*, 2007).

Depois da adesão, os conídios são endocitados, sugerindo a habilidade dos dermatófitos em invadir células. Em seguida, esses fungos utilizam macromoléculas, como proteínas, carboidratos e lipídios, presentes no tecido do hospedeiro, como fontes de carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre, captando os nutrientes necessários para a manutenção de seu desenvolvimento e crescimento. No entanto, a seletividade da membrana plasmática impede que essas macromoléculas sejam transportadas para o interior das células fúngicas, sendo necessária sua quebra em compostos menores. Para isso, os dermatófitos contam com uma maquinaria enzimática formada por uma variedade de enzimas hidrolíticas, tais como proteases, lipases, elastases, colagenases, fosfatases e esterases (PERES *et al.*, 2010).

Esse maquinário enzimático constitui um importante passo no processo de infecção, pois permite a hidrólise dos componentes estruturais da epiderme, proporcionando a invasão pelo fungo. Por isso, essas enzimas são caracterizadas como um importante fator de virulência dos dermatófitos. Dentre a variedade de enzimas secretadas, as mais estudadas e relacionadas com a patogenicidade desses fungos são as enzimas proteolíticas, em especial as proteases queratinolíticas ou queratinases, pois realizam a catálise da queratina, uma proteína fibrosa de alto peso molecular, rica em cisteína e muito importante na proteção do organismo, formando o estrato córneo da epiderme (FRASER; PARRY, 2005; VERMOUT *et al.*, 2008). Em hospedeiros imunocomprometidos, a infecção pode atingir a derme através da produção de proteases que degradem seus principais constituintes, a elastina e o colágeno (LENG *et al.*, 2009).

Depois de instalado no tecido do hospedeiro, os dermatófitos e seus metabólitos induzem uma resposta imune inata através dos queratinócitos, ativando os mecanismos ou mediadores de resposta imune. Essas células secretam vários fatores solúveis capazes de regular a resposta imune, tais como fatores de crescimento (bFGF – Fator de Crescimento de Fibroblasto básico; TGF- α e TGF- β – Fatores de Crescimento Transformante; TNF- α – Fator de Necrose Tumoral),

interleucinas (IL-1, IL-3, IL-6, IL-7 e IL-8) e fatores de estimulação de colônias (CSFs). Em adição à produção desses fatores solúveis, os queratinócitos também expressam importantes moléculas de superfície celular, tais como o MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) e moléculas de adesão, sugerindo que eles podem funcionar como alvos imunológicos (WAGNER; SOHNLE, 1995).

Os dermatófitos, por outro lado, são capazes de utilizar diversos mecanismos para conter o sistema imunológico ou induzir danos nas vias de defesa imune, tais como: inibição dos linfócitos através de manana, uma glicoproteína da parede celular; alteração das funções dos macrófagos; ativação diferencial dos queratinócitos, diminuindo sua proliferação e secreção diferencial de proteases (VERMOUT *et al.*, 2008).

2.2.2 Aspectos clínicos

Os aspectos clínicos das dermatofitoses apresentam-se de forma bastante diversificada, dependendo de fatores como a espécie do fungo, a região do corpo afetada e seu nível de queratinização e o estado imunológico do hospedeiro. Geralmente, as infecções causadas pelos dermatófitos são nomeadas de acordo com a localização anatômica envolvida, anexando o termo em Latim que designa o local do corpo juntamente com a palavra latina “*tinea*” que significa verme ou traça. Dentre os principais casos, destacam-se *Tinea corporis*, *Tinea cruris*, *Tinea faciei*, *Tinea manus*, *Tinea pedis*, *Tinea capitis*, *Tinea barbae* e *Tinea unguium* (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; DEGREEF, 2008; PERES *et al.*, 2010).

- a) *Tinea corporis*: É uma infecção típica de pele glabra e habitualmente afeta o tronco, ombros, extremidades e a região da face. Pode ser causada por todos os dermatófitos conhecidos. Entretanto, é mais comum ser causada pelo agente etiológico predominante na região. A lesão é circular, eritematosa e com as bordas elevadas (FIGURA 3A). Nas formas mais inflamatórias, geralmente causadas por zoofílicos e geofílicos, podem se formar crostas, vesículas, pápulas e até mesmo pústulas. Os antropofílicos, como o *T. rubrum*, causam lesões mais

crônicas, sem inflamação e com extensas lesões (DEGREEF, 2008; DIEGO, 2011).

- b) *Tinea cruris*: É uma infecção caracterizada por uma reação inflamatória crônica ou aguda localizada na região inguinal. Essa micose geralmente acomete mais adultos que crianças e é três vezes mais frequente em homens que em mulheres. O agente etiológico mais comum é o *T. rubrum*. No entanto, outras espécies, como o *T. interdigitale* e o *E. floccosum*, são também relacionadas como causadores da doença. As lesões podem começar unilaterais com posterior infecção de ambas as virilhas, ocorrendo a formação de regiões eritematosas centradas nas pregas inguinais. Estas podem se estender desde as partes inferiores das coxas até a área proximal do abdômen e região púbica inferior, períneo e nádegas. A atividade periférica é caracterizada por escamação fina e a presença de pápulas e pústulas. Na forma crônica, as lesões são secas com um aspecto anular ou aciforme, incluindo a presença de pápulas ou pequenos nódulos foliculares. *Tinea cruris* provoca coceira ou sensação de ardor (DEGREEF, 2008; HAVLICKOVA; CZAIIKA; FRIEDRICH, 2008).
- c) *Tinea faciei*: Essa micose representa a *Tinea corporis* da região facial. Embora exista semelhança entre essas lesões, as características da *Tinea faciei*, como a vermelhidão e as fronteiras das bordas, são menos pronunciadas (FIGURA 3B). Os agentes etiológicos causadores podem variar de acordo com as regiões geográficas; entretanto, geralmente, essas lesões são causadas por dermatófitos zoofílicos, em que as fontes da infecção são animais de estimação ou partes do corpo já infectadas (DEGREEF, 2008).
- d) *Tinea manus*: Esse tipo de micose acomete a palma das mãos, é muito raro e normalmente lesiona apenas uma das mãos (FIGURA 3C). Quando as duas mãos são lesionadas, é utilizado o termo *Tinea*

manuum para a infecção. O *T. rubrum* é o agente etiológico mais comum. As lesões são secas com descamação difusa, caracterizadas pela acentuação das pregas de flexão das palmas das mãos (DEGREEF, 2008).

- e) *Tinea pedis*: Esse tipo de lesão também é bastante conhecido como “pé-de-atleta”, acometendo a região dos pés, principalmente a planta e os dedos (FIGURA 3D). Existem três formas clínicas da *Tinea pedis*: interdigital, vesicular e eritematosa. Entretanto, a forma mais frequente é a interdigital com descamação e formação de fissuras, geralmente no quarto espaço interdigital. Os agentes etiológicos mais comuns são *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *E. floccosum* (DIEGO, 2011).
- f) *Tinea capitis*: É uma infecção caracterizada pela invasão do folículo piloso e da pele circundante (FIGURA 3E). Os agentes etiológicos pertencem aos gêneros *Trichophyton* e *Microsporum*. Nessa lesão, os cabelos são quebrados próximos à pele, produzindo áreas tonsuradas com pequenos fragmentos de cabelos que ainda estão implantados. Apresentam duas formas clínicas: a inflamatória e a não-inflamatória (DIAS *et al.*, 2013).
- g) *Tinea barbae*: É um tipo de *Tinea faciei*. Entretanto, refere-se especificamente à infecção localizada na área da barba. Geralmente, ocorrem em homens adultos e adolescentes no período pós-puberdade. Os dermatófitos zoofílicos *T. verrucosum* e *T. mentagrophytes* são os patógenos mais comuns causadores desse tipo de lesão, causando uma erupção pustulosa inflamatória com formação de crostas ou de Kerion (FIGURA 3F) (MORIARTY; HAY; JONES, 2012).
- h) *Tinea unguium*: Essa é uma infecção localizada nas unhas, possuindo como agente etiológico os dermatófitos *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *E. floccosum*. O termo onicomicose é utilizado para toda e qualquer

infecção em unhas, seja causada por dermatófito ou não-dermatófito. Essa lesão apresenta três formas clínicas: distal e/ou subungueal lateral, superficial branca e subungueal proximal. A infecção é caracterizada pela distrofia das unhas (FIGURA 3G) (DIAS *et al.*, 2013).

2.2.3 Epidemiologia

Os níveis das lesões e os agentes etiológicos das dermatofitoses variam de acordo com a região geográfica, as condições socioeconômicas e os habitats. Algumas espécies de dermatófitos exibem distribuição mundial, enquanto que outras espécies são limitadas a continentes ou regiões geográficas específicas. Além de fatores de risco, como a predisposição genética, o gênero e o tabagismo, existem vários outros fatores que contribuem para a distribuição das dermatofitoses pelo mundo, incluindo a intensificação da migração, turismo em massa, aumento da quantidade de animais domésticos, aumento da incidência nos casos de diabetes mellitus e doenças vasculares e o envelhecimento populacional (HAVLICKOVA; CZAIIKA; FRIEDRICH, 2008; NENOFF *et al.*, 2014; HAYETTE; SACHELI, 2015).

As dermatofitoses são bastante frequentes em países tropicais e subtropicais, pois apresentam condições climáticas propícias para o desenvolvimento dos dermatófitos. A presença dessas micoses é ainda maior em regiões com situação econômica precária. O continente africano, por exemplo, além de possuir um clima favorável para o desenvolvimento dos dermatófitos, apresenta vários problemas de ordem socioeconômica, que tornam difícil o diagnóstico e terapia, contribuindo para a extensa quantidade dessas infecções de pele (HAVLICKOVA; CZAIIKA; FRIEDRICH, 2008).

As dermatofitoses tratam-se de tipo de infecção muito comum, afetando entre 20 e 25% da população mundial (HAVLICKOVA; CZAIIKA; FRIEDRICH, 2008; ACHTERMAN; WHITE, 2012). Os dermatófitos antropofílicos são os maiores causadores das dermatofitoses, estando associados à cerca de 70% dos casos, seguido dos zoofílicos, que são responsáveis por aproximadamente 30% dos casos, enquanto que os geofílicos raramente são encontrados em infecções humanas (WHITE *et al.*, 2008).

Figura 3 – Aspectos clínicos das dermatofitoses



Fonte: DEGREEF, 2008; ILKIT; DURDU, 2015.

(A) *Tinea corporis* causada por *T. verrucosum*. (B) *Tinea faciei* causada por *T. mentagrophytes*. (C) *Tinea manus* causada por *T. rubrum*. (D) *Tinea pedis* causada por *T. interdigitale*. (E) *Tinea capitis* causada por *M. canis*. (F) *Tinea barbae* causada por *T. verrucosum*. (G) *Tinea unguium* causada por *T. unguium*.

As espécies mais frequentemente associadas aos casos de dermatofitoses em humanos são aquelas pertencentes ao gênero *Trichophyton*, seguidas do gênero *Epidermophyton* e *Microsporum*. Dentro do gênero *Trichophyton*, a espécie *T. rubrum* corresponde ao agente etiológico predominante, seguida por *T. mentagrophytes*, *T. verrucosum* e *T. tonsurans*. Dentre as infecções, a *Tinea corporis*, *Tinea cruris* e *Tinea pedis* estão entre as mais frequentes (LAKSHMIPATHY; KANNABIRAN, 2010).

2.2.4 Tratamento

Na maioria das vezes, o tratamento das dermatofitoses é primariamente determinado pela resposta imune apresentada pelo hospedeiro. A infecção desenvolve-se quando o dermatófito consegue ultrapassar os mecanismos de defesa do organismo ou evitar suas respostas imunológicas. Com isso, faz-se necessário a utilização de drogas fungicidas ou fungistáticas que visem especificamente o agente infeccioso, evitando danos ao hospedeiro (PERES *et al.*, 2010).

O tratamento das dermatofitoses é geralmente demorado e dispendioso, envolvendo o uso de duas classes principais de drogas antifúngicas: os azóis e as alilaminas. Além desses, outro fármaco também bastante utilizado é a griseofulvina (GUPTA; COOPER, 2008; PERES *et al.*, 2010).

- a) Azóis: São divididos em dois grupos de acordo com a quantidade de átomos de nitrogênio no anel azol; os imidazóis, possuindo dois átomos e os triazóis, possuindo três átomos. Normalmente, os azóis são caracterizados por serem fungistáticos. Entretanto, também podem exercer ação fungicida quando em elevadas concentrações. Essas drogas agem através da inibição da enzima lanosterol 1,4- α dimetilase, importante na biossíntese do ergosterol, um componente essencial da membrana celular fúngica, pois participa da reação de desmetilação do precursor lanosterol. Assim, tais compostos são capazes de inibir a biossíntese normal do ergosterol, modificando sua composição bioquímica e, conseqüentemente, detendo o crescimento do fungo.

Dentre os imidazóis utilizados no tratamento de dermatofitoses, destaca-se o cetoconazol; entre os triazóis, os mais utilizados são o itraconazol, fluconazol e o voriconazol. Estes, dependendo da quantidade ingerida e do tempo de tratamento, apresentam toxicidade, levando a efeitos colaterais como dor de cabeça, vômito, náusea, gastrite, hepatite, hipertensão e hepatotoxicidade. (SHEEHAN; HITCHCOCK; SIBLEY, 1999; DIAS *et al.*, 2013; GUPTA; COOPER, 2008; SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2014).

- b) Alilaminas: Nesta classe de droga antifúngica, a mais utilizada é a terbinafina, que age inibindo a biossíntese de ergosterol via inibição da epoxidase do esqualeno, em uma fase mais precoce que os azóis. Essa enzima é responsável pela ciclização do esqualeno em lanosterol. A depleção do ergosterol e o acúmulo do esqualeno afetam a estrutura e a função da membrana. A terbinafina é considerada um fármaco seguro, com efeitos colaterais leves e transitórios como dor de cabeça, náuseas e erupção cutânea; entretanto, alguns casos de problemas hematológicos e hepatológicos já foram relatados (ELEWSKI; OHIO, 1993; GEORGOPAPADAKOU, 1998; LECHA *et al.*, 2005);
- c) Griseofulvina: É um metabólico produzido pelo fungo *Penicillium griseofulvum* e bastante utilizado no tratamento de dermatofitoses há cerca de quarenta anos. Trata-se de uma droga fungistática e apesar de seu mecanismo de ação não ser bem conhecido, acredita-se que seja capaz de dificultar o crescimento dos dermatófitos através da inibição da mitose celular, síntese de ácido nucléico e interferência na função do fuso e microtúbulos citoplasmáticos através da ligação entre as tubulinas α e β . Griseofulvina é bem aceita na maioria dos pacientes, principalmente em crianças. A maior parte dos efeitos colaterais é leve, incluindo dores de cabeça, reações gastrointestinais e erupções cutâneas (ODDS; BROWN; GOW, 2003; ZHANG; CAMP; ELEWSKI, 2007).

2.2.5 Resistência aos antifúngicos

Atualmente, existe um número considerável de agentes antifúngicos e seus derivados no mercado farmacêutico, os quais vêm adquirindo um certo aprimoramento, como potência e farmacocinética melhoradas e uma diminuição da toxicidade. Essas drogas precisam ser suficientemente específicas para o agente infeccioso, a fim de evitar danos ao hospedeiro. No entanto, essa especificidade é limitada pela falta de conhecimento suficiente sobre a patogenicidade, virulência e mecanismos de resistência aos fármacos dos patógenos. Além disso, os alvos celulares dessas drogas, tais como as enzimas envolvidas na síntese do ergosterol, ácidos nucleicos e a formação dos microtúbulos, são extremamente limitados, devido às semelhanças existentes entre os fungos e seus hospedeiros (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008).

Geralmente, os casos de recorrência das dermatofitoses são associados à descontinuidade do tratamento; entretanto, existem relatos de resistência clínica à alguns fármacos (MUKHERJEE *et al.*, 2003; ZOMORODIAN; UTHMAN; TARAZOOIE, 2007). Essa resistência clínica é definida como a persistência ou progressão de uma infecção mesmo diante de uma terapêutica antimicrobiana adequada e pode ser classificada em intrínseca ou adquirida. No caso da resistência intrínseca, uma característica específica responsável pela resistência é inerente a todos os membros de uma determinada espécie e provavelmente surgiu durante o processo de evolução. A resistência adquirida refere-se às estirpes resistentes que emergem de uma população anteriormente sensível à droga (HAYES; WOLF, 1990).

Os mecanismos desenvolvidos por esses microrganismos para neutralizar os efeitos dos antifúngicos baseiam-se em três principais processos: redução da concentração do fármaco no interior da célula; diminuição da afinidade da droga pelo alvo celular e modificações no metabolismo para contrabalancear o efeito das drogas (VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012). Os mecanismos de resistência associados às principais classes de antifúngicos usados em dermatofitoses estão descritos a seguir:

- a) Azóis - 1) Redução da concentração do fármaco no interior da célula que ocorre através de eventos de efluxo da droga através de proteínas transportadoras de membrana. Em *T. rubrum*, foi identificado o gene *TruMDR1* que codifica o transportador *ATP-binding cassette* (ABC). Este gene é superexpresso na presença da droga, sugerindo sua participação no evento de efluxo (CERVELATTI *et al.*, 2006; MARANHÃO *et al.*, 2009). 2) Adaptação ao stress celular como, por exemplo, em *T. rubrum*, quando na presença do fármaco ocorre a superexpressão do gene *TR0036* que codifica a hidrolase de éster carboxílico. Embora, o papel fisiológico dessa esterase não seja bem conhecido, sabe-se que essa enzima é secretada por esse fungo (PAIÃO *et al.*, 2007; MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008).
- b) Alilaminas - 1) Modificação do alvo enzimático por mutação. Na presença da droga terbinafina, ocorrem mutações no gene que codifica a enzima epoxidase do esqualeno, levando a substituições nos aminoácidos que, provavelmente, estão relacionadas à ligação do fármaco com a enzima (OSBORNE, *et al.*, 2005). 2) Redução da concentração do fármaco no interior da célula através do aumento de seu efluxo. Em *T. rubrum*, o gene *TruMDR2*, que codifica um tipo de transportador de membrana ABC, quando interrompido gera uma maior sensibilidade da cepa mutante ao fármaco (FACHIN *et al.*, 2006). 3) Adaptação ao stress através de um mecanismo semelhante ao dos azóis.
- c) Griseofulvina - 1) Redução da concentração do fármaco no interior da célula através do aumento de seu efluxo. Na presença da droga, tanto o gene *TruMDR1* quanto o *TruMDR2* têm os níveis de expressão aumentados, participando do efluxo do medicamento (CERVELATTI *et al.*, 2006; FACHIN *et al.*, 2006). 2) Adaptação ao stress através de um mecanismo semelhante ao dos azóis e alilaminas (FACHIN; CONTEL; MARTINEZ-ROSSI, 2001).

Portanto, diante desse quadro caracterizado pela ineficiência e toxicidade da grande maioria dos fármacos existentes, fica evidente a necessidade da busca por novos agentes antifúngicos. Uma alternativa bastante promissora e que tem ganhado importância nos últimos anos é a utilização das plantas medicinais (RAHMAN *et al.*, 2014).

2.3 Plantas medicinais

Durante muitos séculos, as plantas medicinais têm sido fonte de vários compostos biologicamente ativos e bastante utilizadas, na forma de material bruto ou sob a forma de compostos puros, no tratamento de várias doenças. Dentre as diversas propriedades terapêuticas já relatadas, estão as atividades antitumorais, hipoglicemiantes, antioxidantes, antifúngicas e anti-inflamatórias. Além da ampla atividade farmacológica, esses produtos apresentam-se como seguros para a saúde humana (KALAIIVANAN; CHANDRASEKARAN; VENKATESALU, 2013; VALENTE *et al.*, 2013).

O uso de plantas no tratamento de doenças de pele, incluindo as infecções fúngicas, é uma prática muito antiga e comum em várias partes do mundo (IROBI; DARAMOLA, 1993). A propriedade antifúngica encontrada nesses compostos biologicamente ativos, como nas proteínas, deve estar na necessidade natural de defesa das plantas, pois estas são alvos frequentes do ataque de fungos (RATHER *et al.*, 2015). Existem várias classes de proteínas e peptídeos vegetais com atividade antifúngica, dentre estas podem ser citadas as quitinases, defensinas, proteínas transferidoras de lipídeos, tioninas, lectinas e albuminas 2S (KOO *et al.*, 2004; REGENTE *et al.*, 2005; AGIZZIO *et al.*, 2006).

Considerando o potencial antifúngico de vários peptídeos e proteínas envolvidos na defesa das plantas, foi que essas macromoléculas começaram a ganhar importância no tratamento de infecções de pele, existindo, na última década, vários relatos de suas atividades contra diversas espécies de fungos patogênicas ao homem, merecendo destaque as lectinas (AERTS *et al.*, 2007; KANOKWIROON *et al.*, 2008; HAYES *et al.*, 2013; KLAFKE *et al.*, 2013). Estas são proteínas ligantes à carboidratos que se ligam de forma reversível; algumas delas capazes de aglutinar células ou

precipitar polissacarídeos e glicoconjugados. De acordo com a estrutura celular e relações evolutivas, as lectinas vegetais podem ser divididas em sete famílias: lectinas de leguminosas, proteínas inativadoras de ribossomos, família das amarantinas, lectinas do floema de cucurbitáceas, lectinas ligantes à manose de monocotiledôneas, lectinas do tipo jacalina e lectinas ligantes à quitina (VAN DAMME *et al.*, 1998).

Uma das classes de lectinas que mais tem sido reportada como potente inibidor fúngico são as ligantes à quitina, considerando que este carboidrato é um componente muito importante da parede celular dos fungos. A família das lectinas ligantes à quitina compreende todas aquelas que podem se ligar a monômeros ou polímeros de *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), possuindo ou não domínio haveínico. Esse termo refere-se ao domínio da haveína, uma pequena proteína de 43 aminoácidos do látex da *Hevea brasiliensis* (YAO *et al.*, 2010).

Existem vários relatos de lectinas ligantes à quitina com atividade contra espécies de fungos patogênicos ao homem, como a lectina que foi purificada do látex de *H. brasiliensis*, com potente atividade contra as espécies *C. albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* (KANOKWIROON *et al.*, 2008). Em 2012, Gomes e colaboradores isolaram uma lectina ligante à quitina das folhas de *Schinus terebinthifolius* com atividade contra a espécie *C. albicans*.

2.3.1 *Moringa oleifera* Lamarck

M. oleifera, também conhecida como *M. pterygosperma* Gaertn, é um membro da família Moringaceae, que inclui outras 12 espécies. É uma planta nativa do Himalaia no norte da Índia, sendo bastante cultivada em países tropicais e subtropicais, recebendo vários outros nomes, tais como “drumstick tree”, “horseradish tree” e “malunggay” (RAMACHANDRAN; PETER; GOPALAKRISHNAN, 1980; MBIKAY, 2012).

A árvore da *M. oleifera* é decídua, crescendo rapidamente mesmo em solos pobres, sendo bem adaptada a secas, capaz de atingir até 15 m de altura, com um diâmetro entre 20 e 40 cm, possuindo porte arbóreo e tronco único. As folhas são geralmente tripinadas, com folíolos entre 12 e 18 mm, possuindo pecíolos amarelos

ou brancos. Os frutos são secos, fazendo a dispersão das sementes através do vento (RAMACHANDRAN; PETER; GOPALAKRISHNAN, 1980; FERREIRA *et al.*, 2008).

A classificação taxonômica da *M. oleifera* é a seguinte (SACHAN; JAIN; SINGH, 2011):

Reino: Plantae

Sub-reino: Tracheobionta

Super-divisão: Spermatophyta

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Eudicotiledônea

Ordem: Brassicales

Família: Moringaceae

Gênero: *Moringa*

Espécie: *Moringa oleifera* Lamarck

Várias partes dessa planta são utilizadas no consumo humano e, por isso, a *M. oleifera* é vista como um importante produto alimentar, sendo considerada como uma fonte natural de alimentação dos trópicos. As folhas, frutos, flores e vagens são bastante utilizadas como alimento em alguns países, particularmente na Índia, Paquistão, Filipinas, Havaí e várias partes da África. As folhas são fontes ricas em β -carotenos, proteínas, vitamina C, cálcio e potássio e atuam como antioxidantes naturais (ANWAR *et al.*, 2007).

Uma propriedade muito conhecida da *M. oleifera* é a de purificação da água. O extrato aquoso das sementes é bastante utilizado para purificar a água na África e em vários países asiáticos, agindo como um coagulante natural, dada ao seu elevado teor de proteínas catiônicas com massa molecular entre 6 e 16 KDa e ponto isoelétrico bastante alcalino (FERREIRA *et al.*, 2008).

Além de características nutricionais e de purificação da água, *M. oleifera* também apresenta uma série de propriedades terapêuticas. Há vários dados na literatura que descrevem essas propriedades, dentre as quais podem ser citadas: anti-inflamatória, hepatoprotetora, anti-hipertensiva, antitumoral, antioxidante, analgésica, hipoglicemiante e hipocolesterolêmica (SACHAN; JAIN; SINGH, 2011). Em nosso grupo de pesquisa, foi purificada uma proteína da classe das lectinas ligantes à quitina das sementes de *M. oleifera*, denominada Mo-CBP₄ (*Mo*: *Moringa oleifera*; CBP:

“Chitin Binding Proteins”), esta apresentou potente atividade antinociceptiva e anti-inflamatória quando administrada em camundongos via intraperitoneal e oral (PEREIRA *et al.*, 2011).

Extratos de *M. oleifera* apresentaram atividade contra diversos fungos. Recentemente, Mohamedy e Abdalla (2014) testaram o extrato de várias partes da planta, como raízes, folhas e vagens, contra espécies de fungos fitopatogênicos, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Alternaria solani*, *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* e *Macrophomina phaseolina*, e demonstraram que os extratos reduziram significativamente o crescimento micelial e a germinação de esporos de todas as espécies testadas. Nosso grupo de pesquisa também purificou a proteína ligante à quitina de sementes de *M. oleifera* denominada *Mo-CBP₃* que apresentou atividade contra várias espécies de fungos fitopatogênicos, *F. solani*, *F. oxysporum*, *C. musae* e *C. gloesporioides*. A proteína apresentou atividade fungistática ou fungicida, dependendo da concentração utilizada (GIFONI *et al.*, 2012).

Além das atividades citadas, *M. oleifera* apresenta ação contra fungos patogênicos ao homem. Sabe-se que, no Taiwan e na China, houve relatos da utilização satisfatória do extrato etanólico de suas sementes no tratamento caseiro da dermatofitose *Tinea pedis*, popularmente conhecida como pé-de-atleta. Estudos mostraram uma ruptura na membrana plasmática das células fúngicas depois de 24 horas tratadas com o extrato (CHUANG *et al.*, 2007). Mais recentemente, em nosso grupo de pesquisa, foi isolada outra proteína ligante à quitina, *Mo-CBP₂*, que se mostrou capaz de inibir o crescimento de cepas diferentes de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*.

2.3.2 *Mo-CBP₄* (*Moringa oleifera*-Chitin Binding Protein)

Mo-CBP₄ é uma proteína ligante à quitina de sementes da *M. oleifera*, isolada por Pereira e colaboradores (2011). Trata-se de uma proteína básica, apresentando ponto isoelétrico de 10,55, formada por duas cadeias de massas moleculares distintas, uma menor com 3,88 KDa e uma maior com 8,43 KDa, ligadas por pontes dissulfeto, apresentando uma massa molecular total de 11,78 KDa.

Como a maioria das outras proteínas presentes nas sementes de *M. oleifera*, *Mo-CBP₄* apresentou propriedades floculantes. Essa propriedade pode estar associada ao seu caráter catiônico, principalmente, devido à presença de um grande número de resíduos de aminoácidos do tipo arginina e histidina em sua composição, os quais contribuem para as ligações eletrostáticas entre as cargas positivas da proteína e as partículas negativas, por exemplo, de argila e bactérias, reduzindo a repulsão eletrostática e levando a aglomeração de partículas.

Estudos realizados, abordando a caracterização estrutural de *Mo-CBP₄*, mostraram que esta proteína, em condições nativas (pH 7,0 e 25 °C), é composta por 35% de α -hélices, 15% de folhas- β , 19% de voltas e 30% de estruturas desordenadas. Estas estruturas se mantiveram mesmo quando a proteína foi submetida a variações de pH e temperatura, mostrando sua elevada estabilidade. Resistência também foi encontrada quando *Mo-CBP₄* foi submetida à degradação proteolítica com pepsina, tripsina e quimiotripsina, separadamente ou em conjunto. Ademais, testes de estabilidade mostraram que *Mo-CBP₄* pode ser armazenada por um período longo (6 meses), à temperatura ambiente, sem perder sua elevada solubilidade em água, sua capacidade de se ligar à quitina e suas atividades anti-inflamatória e analgésica (COELHO, 2013; PEREIRA, 2014).

Estudos usando espectrometria de massas mostraram que a estrutura primária de *Mo-CBP₄* tem alta similaridade com *Mo-CBP₃*, que é sabidamente uma proteína antifúngica capaz de inibir o crescimento de *F. solani*, *F. oxysporum*, *Colletotrichum musae* e *C. gloesporioides*, causando aumento da permeabilidade da membrana, afetando suas bombas de prótons, e induzindo estresse oxidativo nos esporos dos fungos (GIFONI *et al.*, 2012).

2.3.2.1 Atividade anti-inflamatória e antinociceptiva

Tendo como premissa que *M. oleifera* é bastante conhecida por suas propriedades farmacológicas e que, dentre elas, destaca-se a atividade anti-inflamatória de suas sementes, foi investigado se *Mo-CBP₄* estaria relacionada com tal propriedade. Os estudos mostraram que *Mo-CBP₄* apresentava potente atividade anti-inflamatória e antinociceptiva. Tal proteína, na dose de 10 mg/kg, foi capaz de

inibir em 98,9% (quando administrada pela via intraperitoneal) e 52,9% (após aplicação pela via oral) o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos, um modelo experimental de dor inflamatória tradicionalmente utilizado como ferramenta de triagem para descoberta de novos agentes anti-inflamatórios e analgésicos (PEREIRA *et al.*, 2011).

Posteriormente, em um modelo de peritonite induzida por carragenina em ratos, *Mo-CBP₄*, quando administrada endovenosamente, foi capaz de inibir a migração de neutrófilos já na menor dose (0,1 mg/kg). Todavia, esse efeito não ocorreu de maneira dose-dependente, já que não houve redução do recrutamento de neutrófilos ao aumentar a quantidade de proteína administrada (PEREIRA, 2014).

Os estudos mais promissores foram os realizados quando a proteína foi administrada via oral. Por esta via, em um modelo de peritonite induzida por zymosan, *Mo-CBP₄*, foi capaz de inibir a migração neutrofílica para o local da inflamação e este efeito foi acompanhado de uma diminuição dos níveis da citocina pró-inflamatória IL-1 e aumento da citocina anti-inflamatória IL-10, no soro dos animais. *Mo-CBP₄* também apresentou atividade antinociceptiva, porém este efeito mostrou-se diretamente relacionado ao efeito inibitório do processo inflamatório (PEREIRA, 2014).

3 HIPÓTESE

“*Mo*-CBP₄, uma proteína ligante à quitina isolada a partir das sementes de *Moringa oleifera*, é eficaz em controlar fungos causadores de dermatofitoses, apresentando-se como potencial ferramenta biotecnológica no tratamento dessas infecções”.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Verificar a atividade de *Mo-CBP₄*, uma proteína ligante à quitina de sementes de *Moringa oleifera*, contra fungos causadores de dermatofitoses, utilizando metodologias *in vitro* e *in vivo*.

4.2 Objetivos Específicos

- Purificar *Mo-CBP₄* através de técnicas cromatográficas;
- Avaliar atividade *in vitro* de *Mo-CBP₄* sobre os fungos dermatófitos *T. mentagropytes* e *T. rubrum*, usando ensaios de inibição do crescimento micelial e da germinação de conídios;
- Investigar o modo de ação antifúngico de *Mo-CBP₄*, considerando sua interação com a parede celular, ação na membrana celular e indução de formação de espécies reativas de oxigênio;
- Propor uma formulação tópica de *Mo-CBP₄* a base de hidrogel e testá-la em modelo de dermatofitose *in vivo*.

5 MATERIAIS

5.1 Materiais biológicos

5.1.1 Sementes

Sementes de *Moringa oleifera* Lamarck foram coletadas de árvores situadas no Campus do Pici, da Universidade Federal do Ceará (UFC). A exsiccata da espécie está depositada no Herbário Prisco Bezerra sob o número EAC34591, na UFC.

5.1.2 Fungos dermatófitos

Os fungos dermatófitos *Trichophyton mentagropytes* (isolado clínico) e *Trichophyton rubrum* (isolado clínico) foram obtidos junto à micoteca do Laboratório de Patógenos Emergentes e Reemergentes – LAPERE, Departamento de Patologia da UFC. Estes foram mantidos em meio ágar batata dextrose (BDA) estéril.

5.1.3 Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) fêmeas, com massa corpórea variando entre 20 e 30 gramas, fornecidos pelo Biotério Central da UFC (Biocen-UFC) e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular dessa mesma instituição. Os animais foram mantidos em caixas plásticas contendo água e ração *ad libitum* e aclimatados (25 °C) em ciclo claro/escuro de 12 horas, antes da realização dos experimentos. Todos os esforços foram feitos para minimizar o número e o sofrimento dos animais utilizados. Após o término dos protocolos experimentais, todos os animais foram devidamente eutanasiados por deslocamento cervical ou inalação de halotano.

Os protocolos experimentais foram realizados em conformidade com as diretrizes atuais para o cuidado de animais de laboratório e com as diretrizes éticas para investigações experimentais da dor em animais conscientes, revisto e aprovado

pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC, com o número de protocolo 115/2014.

5.2 Reagentes químicos e outros materiais

A matriz cromatográfica CM Sepharose™ *Fast Flow* foi adquirida da GE Healthcare, Suécia. O antifúngico griseofulvina foi obtido de Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA. O hidrogel de natrosol® hidroxietilcelulose foi obtido da farmácia de manipulação Magistral, Fortaleza – CE. O meio de cultura ágar batata dextrose foi obtido da Kasvi, Curitiba – PR. Os demais reagentes usados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

6 MÉTODOS

6.1 Obtenção de *Mo*-CBP₄

Para obtenção de *Mo*-CBP₄, foi seguido o protocolo de purificação descrito por Pereira (2014). As sementes foram obtidas de frutos maduros, destegumentadas manualmente, sendo as amêndoas submetidas à trituração em liquidificador e, posteriormente, em moinho de café elétrico. A farinha resultante, previamente delipidada com n-hexano (1:10 m/v), foi posta em contato com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M, na proporção 1:10 (m/v) e deixada sob agitação moderada por 4 horas a 4 °C. Em seguida, a suspensão foi filtrada em pano de trama fina e centrifugada a 15.000 x g, 30 minutos, a 4 °C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante filtrado em papel de filtro e denominado de extrato total. Este extrato foi submetido à diálise exaustiva contra água destilada, em membrana de porosidade de 12 kDa, 4 °C, sob agitação moderada. A suspensão obtida foi centrifugada a 15.000 x g, por 30 minutos, a 4 °C. O material proteico presente no sobrenadante, chamado de fração albumínica, foi separado do precipitado (fração globulínica) por centrifugação nas mesmas condições acima. A fração albumínica foi liofilizada e utilizada na cromatografia de afinidade em matriz de quitina.

O primeiro passo cromatográfico foi realizado em matriz de quitina (192,3 mL; 3,5 x 20,0 cm), equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M. Um grama da fração albumínica foi solubilizado em 30 mL de tampão de equilíbrio e centrifugada a 8.000 x g, por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi aplicado na matriz, deixando em repouso por 1 hora. O material não retido foi obtido com o tampão de equilíbrio, em um fluxo de 30 mL/h e descartado. As proteínas ligantes à quitina foram eluídas com ácido acético 0,05 M, em fluxo de 60 mL/h, coletando-se frações de 4,5 mL. As frações eluídas foram monitoradas por leitura de absorbância a 280 nm. O pico proveniente da eluição com ácido acético (P_{AC}) foi reunido e dialisado contra água destilada, liofilizado e acondicionado em frascos hermeticamente fechados, a 4 °C.

Para o segundo passo cromatográfico, foi utilizada a matriz de CM-Sepharose™ *Fast Flow* (GE Healthcare; 53 mL; 1,5 x 7,5 cm), previamente equilibrada

com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2. Quatrocentos miligramas de P_{AC} foram ressuspendidos em 20 mL de tampão de equilíbrio e centrifugados a 8.000 x g, por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi aplicado na coluna e as proteínas foram eluídas em fluxo contínuo de 45 mL/h, em frações de 4,5 mL. A cromatografia foi monitorada através de leituras de absorvância a 280 nm. Todas as proteínas eluídas receberam a denominação de *Mo-CBP* (*Mo*: *Moringa oleifera* e *CBP*: *chitin-binding protein*), acrescidas de um número na ordem em que foram eluídas. As proteínas não retidas foram obtidas utilizando o tampão de equilíbrio. As proteínas retidas foram eluídas com o tampão de equilíbrio acrescido de concentrações crescentes de NaCl. *Mo-CBP*₄ foi o pico eluído com tampão de equilíbrio acrescido de NaCl 0,6 M. O esquema completo de purificação está representado na Figura 4.

6.1.1 Determinação do teor de proteínas

A determinação de proteínas totais foi realizada seguindo a metodologia descrita por Bradford (1976). A 100 µL de amostra, em diversas concentrações, foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford. A mistura foi agitada e após 10 minutos foram feitas as leituras das absorvâncias em espectrofotômetro (Biochrom, Libra S12) a 595 nm. A concentração proteica foi estimada através de uma curva padrão obtida a partir de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA).

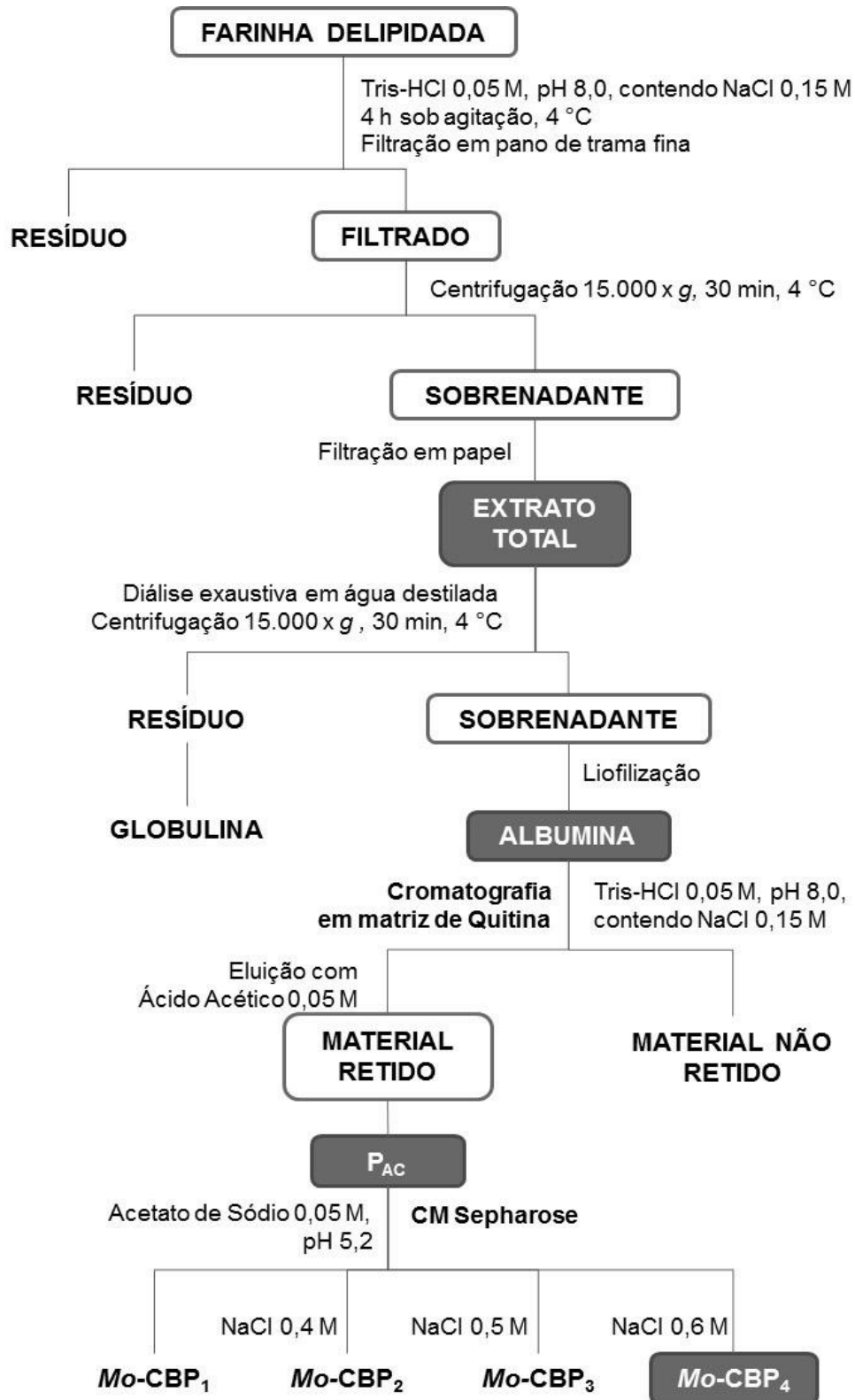
6.2 Avaliação da atividade antidermatofítica *in vitro* de *Mo-CBP*₄

6.2.1 Procedimentos gerais dos ensaios antifúngicos

Os procedimentos gerais e comuns em todos os ensaios de atividade antifúngica foram realizados baseados na metodologia descrita por Barros, Santos e Hamdan (2007) e são descritos a seguir:

- a) Cultivo dos isolados:** Os fungos foram cultivados em placas de Petri, em meio ágar batata dextrose, a 28 °C e umidade adequada para induzir a esporulação.

Figura 4 - Esquema geral de purificação da *Mo*-CBP₄ a partir de farinha delipidada de sementes de *M. oleifera*



Fonte: PEREIRA, 2014.

- b) Preparação do inóculo:** A suspensão do inóculo dos dermatófitos foi preparada de culturas com 7 a 10 dias de crescimento para o *T. mentagrophytes* e 14 dias para o *T. rubrum*. As colônias foram recobertas com 10 mL de salina (0,15 M) estéril e a superfície foi raspada com auxílio de uma alça de Drigalski estéril. A mistura de conídios e fragmentos de hifas obtidas foi então filtrada em algodão estéril e coletada em tubos estéreis, removendo grande parte dos fragmentos de hifas e produzindo um inóculo composto apenas por conídios. O inóculo foi ajustado através da densidade ótica a 620 nm em espectrofotômetro para uma concentração final de 4×10^6 conídios/mL (ESPINEL-INGROFF *et al.*, 1997).
- c) Preparação da amostra:** *Mo*-CBP₄ foi ressuspensa em água destilada e previamente filtrada em filtros estéreis com poros de 0,22 µm de diâmetro. O antifúngico padrão utilizado como controle positivo foi a Griseofulvina, o mesmo foi ressuspensa em dimetilsulfóxido 100% (DMSO) e também submetido à filtração. Durante o ensaio, o DMSO teve sua concentração reduzida para 1%.

6.2.2 Teste de susceptibilidade dos fungos *in vitro*

Foi realizado um teste para determinar quais cepas de fungos dermatófitos seriam susceptíveis a *Mo*-CBP₄. Foram testadas duas cepas clínicas, uma de *T. mentagrophytes* e uma de *T. rubrum*. O ensaio foi realizado em placas de microtitulação de poliestireno de 96 poços. Uma alíquota de 100 µL da suspensão de microconídios de *T. mentagrophytes* foi incubada com 50 µL de solução de *Mo*-CBP₄, na concentração de 250 µg/mL, e 50 µL de caldo batata dextrose, em concentração equivalente a 4 vezes aquela recomendada pelo fabricante, por poço. Para o *T. rubrum*, a proteína foi incubada nas concentrações de 250 e 1000 µg/mL. No controle, 100 µL da suspensão de microconídios foram incubados com 50 µL de salina (0,15 M) e 50 µL de caldo batata dextrose. As placas foram incubadas a 28 °C e a avaliação do crescimento dos dermatófitos foi realizada através de leitor automático de microplacas (Model Elx800, Bio-Tek Instruments). As leituras foram realizadas no comprimento de onda de 620 nm, a cada 12 horas, durante 9 dias para o *T. mentagrophytes* e 21 dias para o *T. rubrum*. O percentual de crescimento foi

determinado através de comparação entre as leituras obtidas com a amostra teste e as leituras do controle. O ensaio foi realizado em quintuplicata.

6.2.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM₅₀ e CIM₉₀)

O teste de susceptibilidade de microdiluição em caldo foi realizado de acordo com o documento M38-A2 do “Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI” (CLSI, 2008), com modificações. No ensaio realizado, foi utilizado o meio de cultura caldo batata dextrose. *Mo*-CBP₄ foi testada nas concentrações de 1,95 a 1000 µg/mL e o antifúngico padrão griseofulvina nas concentrações de 0,078 a 10 µg/mL. Essas concentrações foram obtidas através da técnica de diluição seriada.

O ensaio foi realizado em placas de microtitulação de poliestireno de 96 poços. Uma alíquota de 100 µL da suspensão de microconídios de *T. mentagrophytes* foi incubada com 50 µL de solução de *Mo*-CBP₄ ou griseofulvina em diferentes concentrações e 50 µL de caldo batata dextrose, em concentração equivalente a 4 vezes aquela recomendada pelo fabricante, em cada poço. No controle, 100 µL da suspensão foram incubados com 50 µL de salina (0,15 M) ou DMSO (1%) e 50 µL de caldo batata dextrose. As placas foram incubadas a 28 °C e a avaliação do crescimento dos dermatófitos foi realizada através de leitor automático de microplacas (Model Elx800, Bio-Tek Instruments). As leituras foram realizadas no comprimento de onda de 620 nm, a cada 12 horas, durante 14 dias. O ensaio foi realizado em quintuplicata.

As concentrações inibitórias mínimas CIM₅₀ e CIM₉₀ foram definidas como sendo a menor concentração das amostras capaz de produzir inibição de 50 e 90%, respectivamente, no crescimento dos dermatófitos, em relação aos poços contendo apenas o meio de cultura e a salina (0,15 M) incubados com a suspensão padronizada do inóculo.

6.2.4 Ensaio de inibição do crescimento micelial

O ensaio de avaliação de inibição do crescimento micelial foi realizado baseado no protocolo desenvolvido por Broekaert e colaboradores (1989). Nesse

ensaio, alíquotas de 100 µL da suspensão de microconídios de *T. mentagrophytes* foram incubadas com 50 µL de caldo batata dextrose, em concentração equivalente a 4 vezes aquela recomendada pelo fabricante, em placas de microtitulação de poliestireno de 96 poços, durante 4 dias, a 28 °C. Em seguida, 50 µL de solução de *Mo*-CBP₄ na concentração equivalente ao CIM₅₀ ou 50 µL de solução salina 0,15 M (controle negativo) ou 50 µL da solução de albumina sérica bovina (BSA) na mesma concentração de *Mo*-CBP₄ (controle negativo) ou 50 µL da solução de griseofulvina na concentração equivalente ao CIM₅₀ (controle positivo) foram adicionados aos respectivos poços. O crescimento dos dermatófitos foi monitorado através de leitor automático de microplacas (Model Elx800, Bio-Tek Instruments). As leituras foram realizadas no comprimento de onda de 620 nm, a cada 12 horas, durante 14 dias. O percentual de crescimento foi determinado através de comparação das leituras da amostra teste com as leituras dos controles. O ensaio foi realizado em quintuplicata.

6.2.5 Ensaio de inibição da germinação

Para avaliar o efeito de *Mo*-CBP₄ na germinação dos esporos, foi conduzido ensaio de avaliação com base na metodologia descrita por Dhayanithi e colaboradores (2012). No ensaio, realizado em tubos eppendorfs, alíquotas de 100 µL da suspensão de microconídios de *T. mentagrophytes* foram incubadas com 50 µL de caldo batata dextrose em concentração equivalente a 4 vezes aquela recomendada pelo fabricante. Em seguida, nos respectivos microtubos, foram adicionados 50 µL da solução de *Mo*-CBP₄ na concentração de 500 µg/mL (CIM₅₀) ou 50 µL de solução salina 0,15 M (controle negativo) ou 50 µL da solução de BSA na mesma concentração de *Mo*-CBP₄ (controle negativo) ou 50 µL da solução de griseofulvina na concentração equivalente ao CIM₅₀ (controle positivo), incubados durante 24 horas, a 28 °C. Após o período de germinação, os microconídios foram observados em microscópio óptico (Olympus System Microscope BX 60) e contados em câmara de Neubauer, sendo considerado germinados aqueles que apresentaram o tubo germinativo correspondendo a duas vezes o tamanho do microconídio. O percentual de inibição de germinação foi calculado comparando os resultados com a amostra teste com aqueles obtidos nos controles. O ensaio foi realizado em triplicata.

6.2.6 Ensaios de avaliação do modo de ação

6.2.6.1 Ensaio de inibição da germinação na presença de *N*-acetil-D-glucosamina (NAG)

Esse ensaio foi realizado com o intuito de verificar se a presença do monossacarídeo *N*-acetil-D-glucosamina (NAG) seria capaz de interferir no resultado apresentado por *Mo*-CBP₄, no ensaio de inibição da germinação. No ensaio, realizado em microtubos, alíquotas de 100 µL da suspensão de microconídios de *T. mentagrophytes* foram incubadas com 50 µL de caldo batata dextrose, em concentração equivalente a 4 vezes aquela recomendada pelo fabricante. Em seguida, nos respectivos microtubos, foram adicionado 50 µL da solução de *Mo*-CBP₄ na concentração equivalente ao CIM₅₀ ressuspensa em solução de NAG 0,15 M ou 50 µL de solução salina 0,15 M (controle negativo) ou 50 µL da solução de NAG 0,15 M ou 50 µL da solução de *Mo*-CBP₄, não pré-incubada com NAG, na concentração equivalente ao CIM₅₀ e incubados durante 24 horas, a 28 °C. Após o período de germinação, os microconídios foram observados em microscópio óptico (Olympus System Microscope BX 60) e contados em câmara de Neubauer, sendo considerado germinados aqueles que apresentaram o tubo germinativo correspondendo a duas vezes o tamanho do microconídio. O percentual de inibição de germinação foi calculado comparando os resultados das amostras teste com os do controle. O ensaio foi realizado em triplicata.

6.2.6.2 Avaliação da indução da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Para avaliar a capacidade de *Mo*-CBP₄ em induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em microconídios de *T. mentagrophytes*, foi realizado um ensaio *in situ* utilizando 3,3'-diaminobenzidina (DAB), de acordo com protocolo descrito por Mendieta e colaboradores (2006).

Para realização do ensaio, 100 µL da suspensão de microconídios foram incubados com 100 µL da solução de *Mo*-CBP₄ na concentração equivalente ao CIM₅₀, em microtubos, durante 24 horas, a 28 °C. Em seguida, DAB previamente preparado

na concentração de 1 mg/mL foi adicionado. A solução resultante foi mantida em agitação durante 1 hora, a 28 °C. Após o período de agitação, as lâminas com o material a ser analisado foram preparadas e visualizadas em microscópio óptico (Olympus System Microscope BX 60). No controle, 100 µL da suspensão de microconídios foram incubados com 100 µL de solução salina 0,15 M. A presença de grânulos de coloração marrom, resultantes da reação do DAB com peroxidases endógenas do fungo, foi utilizada como indicativo da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). As imagens foram obtidas com câmera digital (Sony, modelo MCV-CD350).

6.2.6.3 Avaliação sobre a permeabilidade da membrana do microconídio

O corante iodeto de propídio (IP) foi usado para avaliar a integridade da membrana celular do fungo na presença de *Mo*-CBP₄. Este fluoróforo funciona como um marcador celular, podendo ligar-se a ácidos nucleicos que compõem o material genético das células desde que haja poros ou rupturas em suas membranas.

Para realização do ensaio, 100 µL da suspensão de microconídios foram incubados com 100 µL da solução de *Mo*-CBP₄ na concentração equivalente ao CIM₅₀, em microtubos, durante 24 horas, a 28 °C. Em seguida, o IP, na concentração de 0,001 M, foi adicionado. A solução resultante foi mantida em agitação durante 1 hora, a 28 °C. Após o período de agitação, as lâminas com o material a ser analisado foram preparadas e visualizadas em microscópio óptico de fluorescência (Nikon Eclipse 80i). No controle, 100 µL da suspensão de microconídios foram incubados com 100 µL de solução salina 0,15 M. Foram considerados microconídios permeabilizados aqueles em que os núcleos se apresentaram fluorescentes. As imagens foram obtidas com câmera digital (Sony, modelo MCV-CD350).

6.3 Avaliação da atividade antidermatofítica *in vivo* de *Mo*-CBP₄

6.3.1 Procedimentos gerais do ensaio antifúngico em modelo animal

6.3.1.1 Preparação do inóculo

A preparação do inóculo para indução da infecção em camundongo foi realizada baseado no protocolo estabelecido por Ghannoum e colaboradores (2004). O fungo *T. mentagrophytes* foi cultivado em placas de Petri, em meio ágar batata dextrose, a 28 °C, para induzir a esporulação. A suspensão do inóculo do dermatófito foi preparada de culturas com 7 a 10 dias de crescimento. As colônias foram recobertas com 10 mL de salina (0,15 M) estéril e a superfície foi raspada com auxílio de uma alça de Drigalski estéril. A mistura de conídios e fragmentos de hifas obtida foi filtrada em algodão estéril e coletada em tubos estéreis, removendo grande parte dos fragmentos de hifas e produzindo um inóculo composto por apenas conídios. A concentração do inóculo final foi ajustada para 4×10^6 conídios/mL, considerando a densidade ótica a 620 nm em espectrofotômetro.

6.3.1.2 Preparação das amostras

As amostras utilizadas no teste *in vivo* foram *Mo-CBP₄* e a griseofulvina. Para otimizar a manipulação destas, aumentando o tempo de contato com a pele dos animais, foi utilizado como veículo um hidrogel à base de natrosol 2%. Com isso, a griseofulvina foi utilizada na dose de 2 mg/g de hidrogel, segundo protocolo descrito por Aggarwal, Goindi e Khurana (2013), e *Mo-CBP₄* foi utilizada nas doses de 5 e 10 mg/g de hidrogel, que são doses progressivamente maiores que a de griseofulvina, a droga de referência. O hidrogel foi preparado adicionando-se 2% de natrosol em água milli-Q, seguido de aquecimento a 60 °C em banho-maria e agitação constante com bastão de vidro até aquisição da consistência de gel. Como a griseofulvina é insolúvel em água, esta foi previamente dissolvida em DMSO 2%.

6.3.2 Modelo de infecção em camundongos

Camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) fêmeas, com massa corpórea entre 20 e 30 gramas, foram mantidos em caixas plásticas individuais, contendo água e ração *ad libitum* e aclimatados (25 °C) em ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais foram inicialmente anestesiados, utilizando uma solução de cloridrato de ketamina 10% e cloridrato de xilazina 5%, via intraperitoneal, na dose de

100 µL/10 g. Posteriormente, realizou-se a antissepsia do animal, utilizando-se um antisséptico comercial. Em seguida, o animal foi tricotomizado na região dorsal, usando uma lâmina de aço inoxidável, e submetido à escarificação para melhor penetração do inóculo. A escarificação foi feita através da utilização de lixa e da própria lâmina. A inoculação consistiu da aplicação cuidadosa de 100 µL da suspensão de microconídios de *T. mentagrophytes* (4×10^6 conídios/mL) no local da pele estressada durante os 3 primeiros dias do experimento. A lesão foi examinada diariamente e registrada com câmera digital (NOKIA, modelo N8). A gravidade e recuperação da lesão foram visualmente classificadas utilizando os escores propostos por Ghannoum, Long e Pfister (2008):

- 0 = sem sinal de infecção;
- 1 = algumas áreas ligeiramente eritematosas na pele;
- 2 = vermelhidão bem definida, inchaço, manchas sem pelos e áreas escamosas;
- 3 = grandes áreas marcadas por vermelhidão, incrustação, descamação e ulceradas em alguns pontos;
- 4 = lesão parcial do tegumento e perda de pelos;
- 5 = extensos danos ao tegumento e completa perda de pelos no local da infecção.

Para cada dia do ensaio, esses escores foram somados e divididos pelo número de animais do grupo, de acordo com a fórmula a seguir, e foram usados para comparar a eficiência dos diferentes grupos de tratamento.

$$M_{EL} = S_{EL}/N$$

Onde:

M_{EL} = média de escores das lesões por grupo

S_{EL} = soma dos escores das lesões por grupo

N = número de animais por grupo

Para avaliar a eficácia dos tratamentos, os escores foram somados e comparados com o controle, seguindo a equação a seguir:

$$\% \text{ Eficácia} = 100 - (T \times 100/C)$$

Onde:

T = soma dos escores do grupo submetido ao tratamento

C = soma dos escores do grupo controle

6.3.3 Desenho experimental

Para o experimento, os animais foram divididos em 6 grupos (A, B, C, D, E e F), cada um contendo 7 animais. Os grupos A e B foram utilizados para determinar a gravidade das lesões e o tempo de curso da doença, funcionando como grupos controle para os tratamentos. Ambos foram submetidos aos mesmos procedimentos (tricotomização e escarificação); entretanto, somente o grupo B foi inoculado. Os grupos C e D consistiram em controles negativo (hidrogel) e positivo (griseofulvina, 2 mg/g), respectivamente, quanto à atividade antidermatofítica. Os grupos E e F foram os grupos experimentais tratados com 5 e 10 mg/g de *Mo*-CBP₄. A aplicação de 0,2 g das amostras controles e experimentais foi feita a partir do 4^o dia após inoculação do *T. mentagrophytes*. A administração foi diária, até o último dia do ensaio.

6.3.4 Estudo da cultura com amostras de tecidos da pele infectados

A instalação e cura da infecção foram monitoradas por meio da cultura de amostras de tecidos da pele de camundongos infectados, através da análise de características macromorfológicas das colônias de *T. mentagrophytes*. Para isso, um camundongo de cada grupo, no auge e fim da doença, foi sacrificado e teve amostras de pele retiradas para cultivo em placas de Petri em meio ágar batata dextrose (BDA), incubadas durante 7 dias, a 28 °C. O crescimento ou não das colônias foi visualizado e fotografado com câmara digital (NOKIA, modelo N8).

6.4 Análise estatística

Os resultados, cuja análise estatística se fez necessária, foram expressos com média \pm erro padrão da média e a avaliação estatística dos dados foi realizada através de ANOVA, testes paramétricos e não-paramétricos, sendo considerados como significativos os resultados que apresentaram $p < 0,05$.

7 RESULTADOS

7.1 Obtenção de *Mo*-CBP₄

Para realização dos experimentos e cumprimento dos objetivos aqui propostos, *Mo*-CBP₄ foi inicialmente purificada e acumulada. Através do procedimento adotado, o extrato total obtido apresentou um teor médio de proteínas correspondente a $205,41 \pm 2,55$ mg/g de farinha (TABELA 1). Da fração albumínica, foram obtidos cerca de $112,45 \pm 3,00$ mg/g de farinha, representando 54,74% das proteínas do extrato total. Com a finalidade de se obter proteínas ligantes à quitina, a fração albumínica foi submetida à cromatografia de afinidade em matriz de quitina, gerando um material proteico não retido e um retido (proteínas ligantes à quitina), que foi eluído com ácido acético 0,05 M, denominado de P_{AC} (FIGURA 5A). O rendimento proteico desta fração após diálise e liofilização foi de $47,57 \pm 5,46$ mg/g de farinha, representando 23,16% das proteínas do extrato total. P_{AC} foi utilizado para o próximo passo cromatográfico.

Na cromatografia de troca iônica em matriz CM-Sepharose, a fração P_{AC} gerou um pico não retido e três picos retidos, os quais foram eluídos com o tampão de equilíbrio (tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2) acrescido de NaCl 0,4 M, 0,5 M e 0,6 M. *Mo*-CBP₄ correspondeu ao quarto pico proteico gerado nessa etapa cromatográfica, eluído com NaCl 0,6 M (FIGURA 5B). Após ser liofilizada, *Mo*-CBP₄ apresentou um rendimento de aproximadamente 13 mg para cada grama de farinha, correspondendo a 6,33% das proteínas do extrato total.

Tabela 1 - Etapas de purificação da *Mo*-CBP₄, com os respectivos teores e rendimentos proteicos

Etapas de purificação	Proteína (mgP/gF)^a	Rendimento (%)^b
Extrato Total	205,41 ± 2,55	100,0
Fração Albumínica	112,45 ± 3,00	54,74
P _{AC} ^c	47,57 ± 5,46	23,16
<i>Mo</i> -CBP ₄ ^d	13,06 ± 1,56	6,33

Fonte: Próprio autor.

Os resultados representam a média ± desvio padrão de seis experimentos similares.

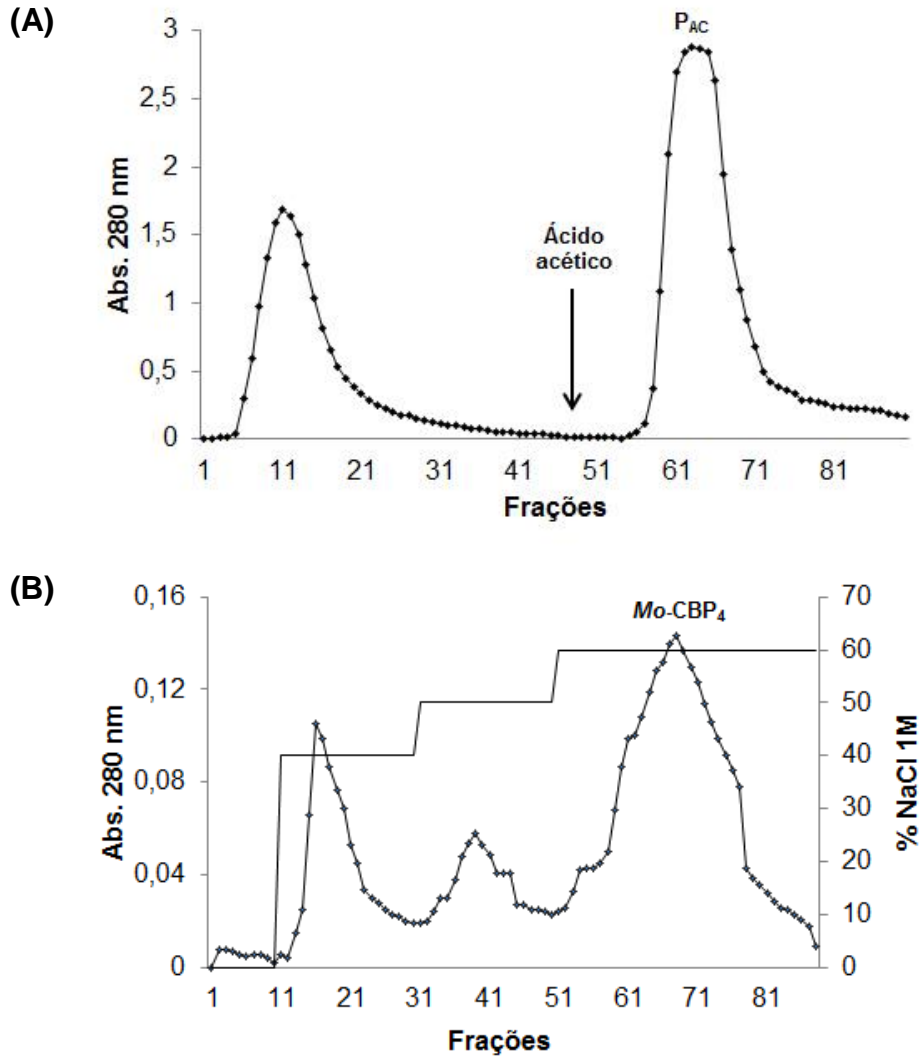
^a Quantidade total de proteína recuperada em miligrama (mgP) por grama de farinha (gF) de sementes de *M. oleifera*, durante cada etapa de purificação

^b Recuperação de proteína em cada etapa de purificação, considerando aquela determinada no extrato total como sendo 100%.

^c Fração proteica ligante à quitina eluída com ácido acético.

^d *Mo*-CBP₄ retida na CM-Sepharose, eluída com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, contendo NaCl 0,6 M.

Figura 5 – Perfis das cromatografias de afinidade e troca iônica para obtenção de *Mo-CBP₄*



Fonte: PEREIRA, 2014.

(A) Cromatografia de afinidade em matriz de Quitina: A fração albumínica das sementes (1 g) foi aplicada em matriz de quitina (192,3 mL; 3,5 x 20,0 cm), previamente equilibrada com Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo 0,15 M de NaCl. P_1 : proteínas não retidas obtidas com o tampão de equilíbrio. P_{AC} : proteínas retidas eluídas com ácido acético 0,05 M. Frações: 4,5 mL; fluxo: 60 mL/h.

(B) Cromatografia de troca iônica em matriz de CM-Sepharose™: P_{AC} (400 mg) foi aplicado em CM-Sepharose (53 mL; 1,5 x 7,5 cm) previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2. $Mo-CBP_4$ corresponde à proteína eluída com o tampão de equilíbrio acrescido de 60% de NaCl 1 M. Frações: 4,5 mL; fluxo: 45 mL/h.

7.2 Atividade antidermatofítica *in vitro* de *Mo*-CBP₄

7.2.1 Susceptibilidade dos dermatófitos *in vitro*

A atividade antifúngica de *Mo*-CBP₄ foi inicialmente testada contra cepas clínicas de duas espécies de dermatófitos, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*, uma cepa para cada espécie. *Mo*-CBP₄, ao final de 9 dias, na concentração de 250 µg/mL foi capaz de inibir em cerca de 35% o crescimento da cepa fúngica da espécie *T. mentagrophytes* (FIGURA 6A). No entanto, a proteína não foi capaz de inibir a cepa da espécie *T. rubrum*, mesmo em uma concentração 4 vezes maior (1000 µg/mL), em um período de avaliação encerrando 21 dias (FIGURA 6B).

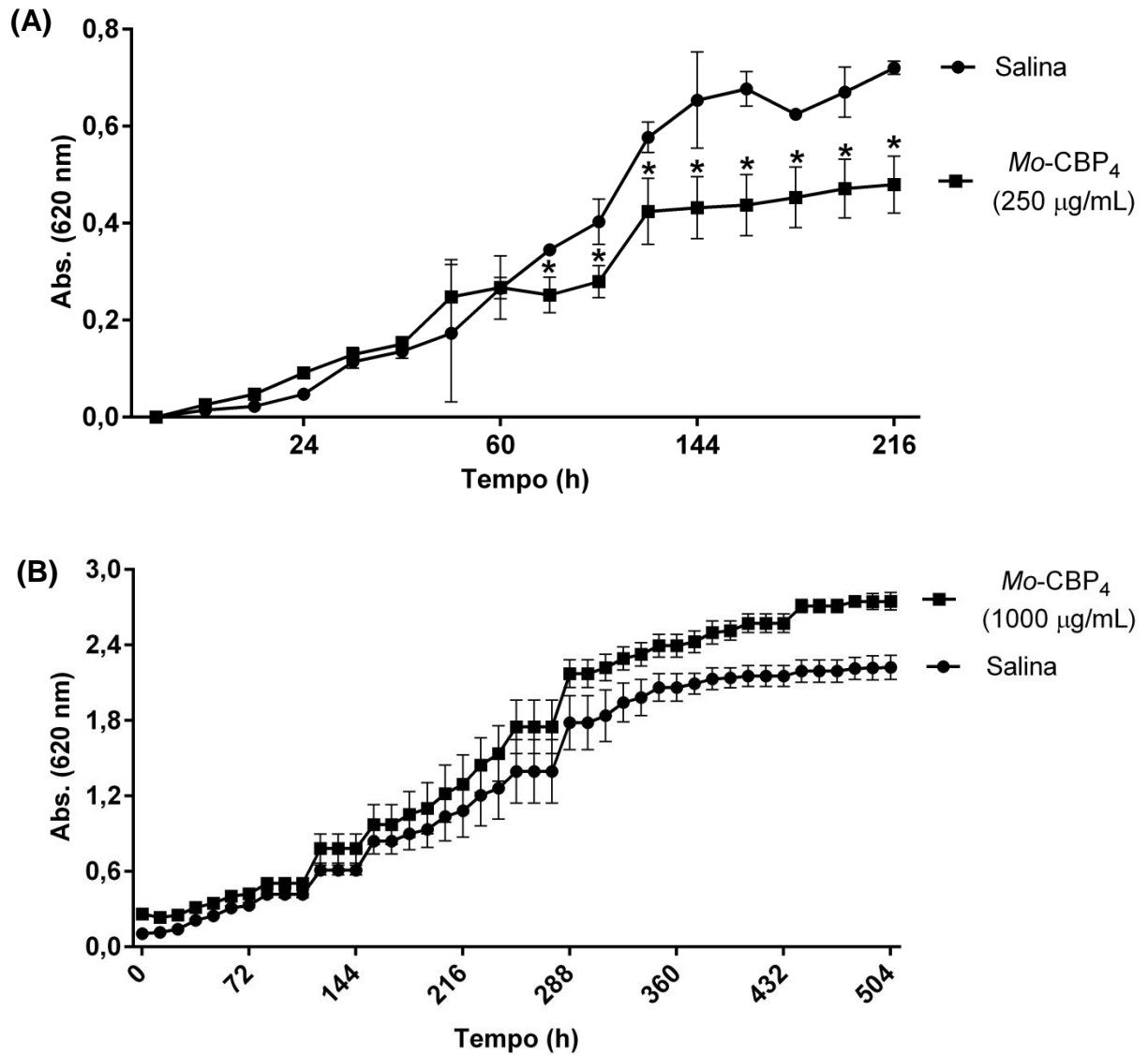
7.2.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM₅₀ e CIM₉₀)

Depois de atestar a atividade antidermatofítica de *Mo*-CBP₄ contra a cepa de *T. mentagrophytes*, a proteína foi incubada, em diferentes concentrações, com o fungo, para determinar a sua CIM₅₀ e CIM₉₀. A griseofulvina foi utilizada como antifúngico de referência. *Mo*-CBP₄ apresentou um CIM₅₀ de 500 µg/mL e CIM₉₀ maior do que a faixa de concentração testada (TABELA 2). Quanto ao antifúngico de referência, os valores do CIM₅₀ e CIM₉₀ foram de 0,156 e 0,625 µg/mL, respectivamente.

7.2.3 Inibição do crescimento micelial

Mo-CBP₄ também foi avaliada quanto ao potencial de inibição do crescimento micelial de *T. mentagrophytes*, ou seja, após a completa germinação do fungo. A proteína foi incubada na concentração de 500 µg/mL (CIM₅₀), após o crescimento do fungo por 4 dias. *Mo*-CBP₄ não se mostrou capaz de inibir o crescimento micelial, exibindo uma curva de crescimento estatisticamente semelhante à curva da solução salina 0,15 M (controle) e à curva da proteína BSA (controle negativo) (FIGURA 7). O antifúngico griseofulvina (controle positivo), na concentração de 0,156 µg/mL (CIM₅₀), conseguiu inibir o crescimento micelial de *T. mentagrophytes*.

Figura 6 – Teste de susceptibilidade *in vitro* dos fungos *T. mentagrophytes* e *T. rubrum* à ação da *Mo*-CBP₄



Fonte: Próprio autor.

Mo-CBP₄ foi incubada nas concentrações de 250 e 1000 µg/mL com os fungos (A) *T. mentagrophytes* e (B) *T. rubrum*, respectivamente, durante 216 horas (9 dias) ou 504 horas (21 dias), em placas de microtitulação incluindo 96 poços, a 28 °C. Salina (NaCl 0,15 M) foi utilizada como controle negativo. Resultados são expressos como média ± desvio padrão de 5 replicatas. *Diferente em relação à salina pela análise de variância ($p < 0,05$).

Tabela 2 - Valores da CIM₅₀ e CIM₉₀ de *Mo-CBP₄* e do antifúngico griseofulvina frente ao fungo *T. mentagrophytes*

Amostra	Valores de CIM (µg/mL)	
	^a CIM ₅₀	^b CIM ₉₀
<i>Mo-CBP₄</i>	500	> 1000
Griseofulvina	0,156	0,625

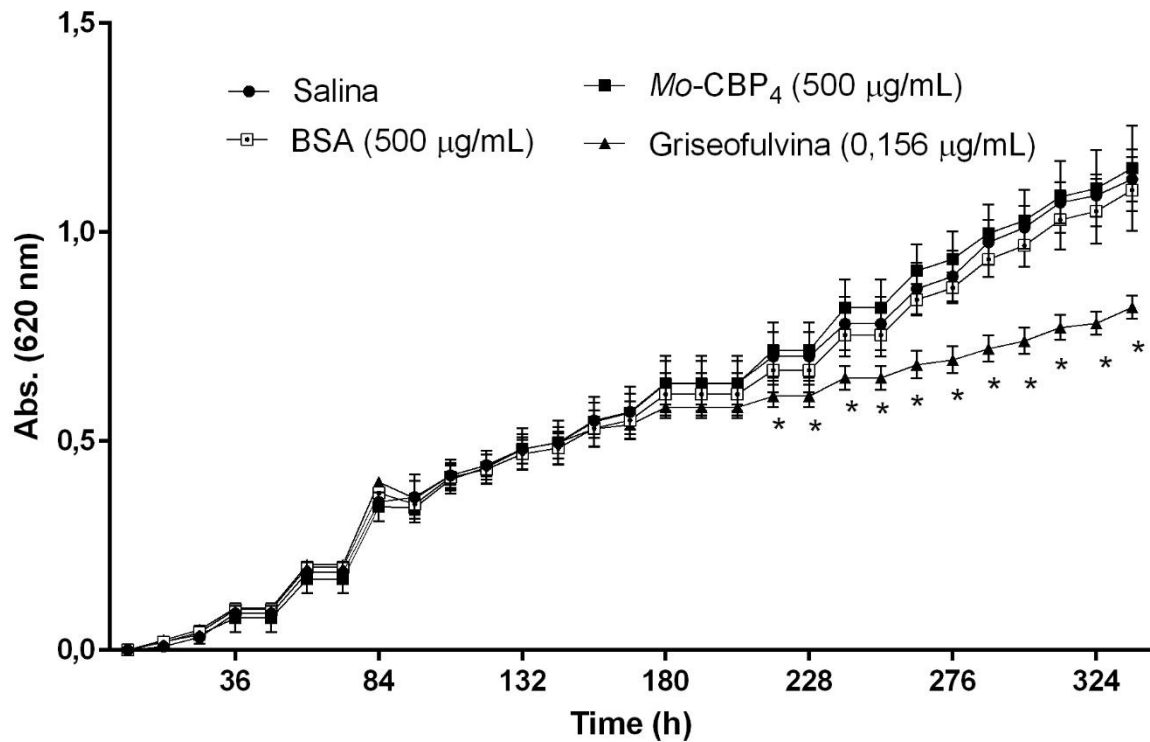
Fonte: Próprio autor.

O ensaio durou 14 dias e os valores representam a média de experimentos em quintuplicata.

^a Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir o crescimento de *T. mentagrophytes* em 50%;

^b Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir o crescimento de *T. mentagrophytes* em 90%;

Figura 7 - Avaliação do efeito de *Mo*-CBP₄ sobre o crescimento micelial do fungo dermatófito *T. mentagrophytes*



Fonte: Próprio autor.

O crescimento micelial foi observado até 336 horas (14 dias). A proteína foi testada na concentração de 500 µg/mL (CIM₅₀). Salina e BSA (500 µg/mL) foram utilizadas como controles negativos. Griseofulvina (0,156 µg/mL) representou o controle positivo. Resultados são expressos como média ± desvio padrão de 5 replicatas. *Diferente em relação à salina pela análise de variância ($p < 0,05$).

7.2.4 Inibição da germinação

Os resultados do efeito de *Mo*-CBP₄ sobre a germinação dos microconídios de *T. mentagrophytes* estão registrados na Figura 8. *Mo*-CBP₄ foi capaz de inibir a germinação dos conídios na concentração de 500 µg/mL (CIM₅₀), apresentando percentual de inibição de 50%, aproximadamente. BSA não apresentou inibição da germinação dos conídios na concentração de 500 µg/mL. Griseofulvina inibiu quase 100% a germinação dos microconídios, representando o controle positivo.

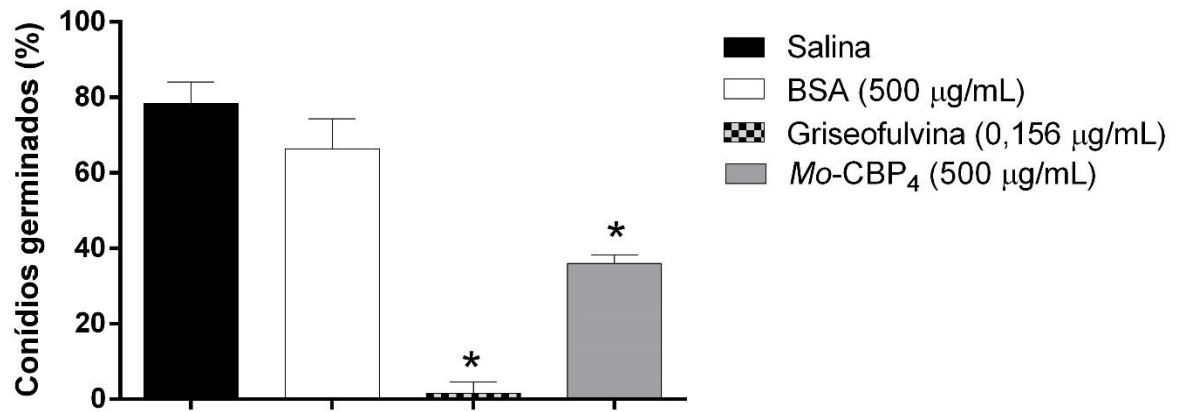
7.2.5 Avaliação do modo de ação

Com o intuito de obter informações de como *Mo*-CBP₄ estaria exercendo sua atividade antifúngica, foram propostas metodologias buscando avaliar sua ação sobre a parede celular e membrana plasmática dos conídios de *T. mentagrophytes*, bem como na produção de espécies reativas de oxigênio.

Inicialmente, foi investigada a participação do sítio de interação a carboidrato (quitina) de *Mo*-CBP₄ na sua ação antifúngica. Ao ser previamente incubada com NAG 0,1 M, *Mo*-CBP₄, na concentração de 500 µg/mL (CIM₅₀), manteve sua ação inibitória sobre a germinação de conídios de *T. mentagrophytes* (FIGURA 9). Os percentuais de inibição foram em torno de 55% e 50% para *Mo*-CBP₄ não incubada ou incubada previamente com NAG, respectivamente, não havendo diferença significativa.

Mo-CBP₄ (500 µg/mL) foi capaz de induzir a produção endógena de espécies reativas de oxigênio (EROs) nos conídios de *T. mentagrophytes*, quando incubados por 24 horas (FIGURA 10). A proteína promoveu a formação de grânulos escuros no interior dos conídios, resultantes da reação do DAB com peroxidases endógenas, fato este não verificado no tratamento com solução salina 0,15 M.

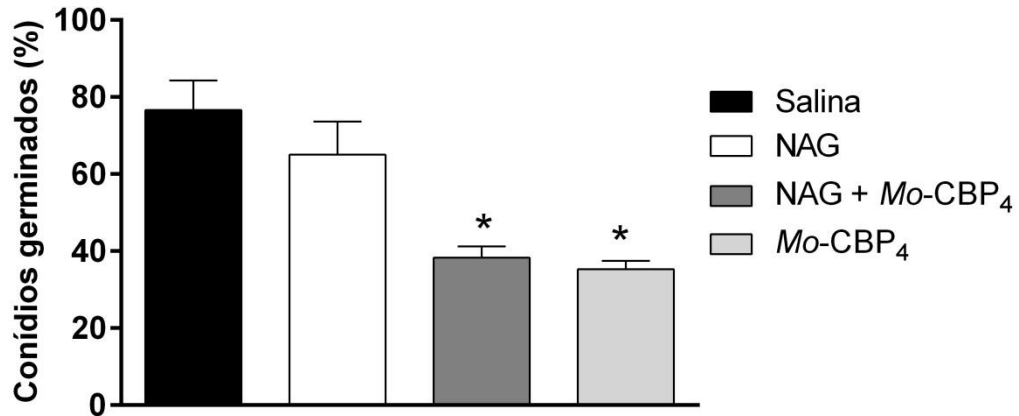
Figura 8 – Avaliação do efeito de *Mo*-CBP₄ sobre a germinação dos conídios do fungo dermatófito *T. mentagrophytes*



Fonte: Próprio autor.

A proteína foi incubada na concentração de 500 µg/mL com uma suspensão de conídios por 24 horas, a 28 °C. Salina, BSA (500 µg/mL) e griseofulvina (0,156 µg/mL) foram utilizados como controles. As colunas verticais representam a média ± desvio padrão de 3 replicatas. *Diferente em relação à salina pela análise de variância ($p < 0,05$).

Figura 9 - Ensaio de inibição da germinação dos conídios do fungo dermatófito *T. mentagrophytes* na presença de *Mo*-CBP₄ incubada previamente ou não com o carboidrato *N*-acetil-D-glucosamina (NAG)



Fonte: Próprio autor.

A proteína, na concentração de 500 µg/mL, foi incubada previamente com NAG 0,1 M, por 1 hora. O tempo de incubação do fungo com *Mo*-CBP₄, tratada ou não com NAG, foi de 24 horas. Salina e NAG foram usados como controles negativos. As colunas verticais representam média ± desvio padrão de 3 replicatas. *Diferente em relação à salina pela análise de variância ($p < 0,05$).

Figura 10 – Efeito de *Mo*-CBP₄ na indução de espécies reativas de oxigênio (EROs) em conídios do dermatófito *T. mentagrophytes*



Fonte: Próprio autor.

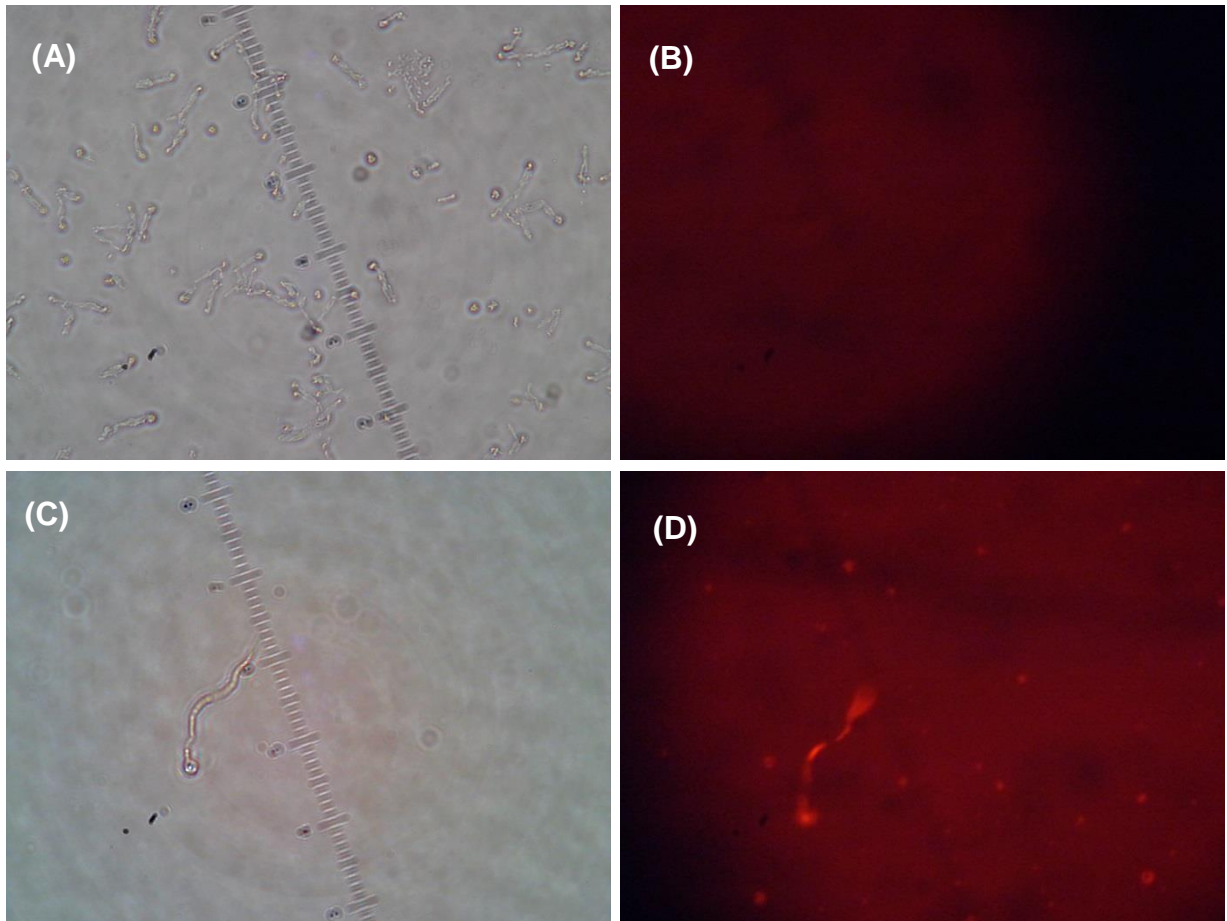
Fotomicrografia em microscópio óptico (400X) dos conídios de *T. mentagrophytes* na presença de diaminobenzidina (DAB), após incubação com (A) salina ou (B) *Mo*-CBP₄ (500 µg/mL), durante 24 horas, a 28 °C. As setas vermelhas indicam presença de grânulos oriundos da reação do DAB com as espécies reativas de oxigênio produzidas pelo conídio.

Adicionalmente, foi investigada a ocorrência de interferência ou não de *Mo*-CBP₄ sobre a permeabilidade da membrana celular dos conídios. A Figura 11 mostra que a proteína (500 µg/mL) foi capaz de promover um aumento na permeabilidade da membrana do conídio de *T. mentagrophytes*, fato observado pela emissão de fluorescência, característica da ligação do iodeto de propídio aos ácidos nucleicos, evidenciando a entrada do marcador no interior da célula. Por outro lado, os conídios incubados com solução salina 0,15 M não mostraram fluorescência no seu interior.

7.3 Avaliação da atividade antidermatofítica *in vivo* de *Mo*-CBP₄

Uma vez atestada a atividade antidermatofítica *in vitro* de *Mo*-CBP₄, foram realizados experimentos *in vivo*, utilizando o modelo de infecção em camundongos. Inicialmente, foram realizados experimentos preliminares com o intuito de observar a severidade das lesões e o tempo de infecção nos animais sem serem submetidos a qualquer tratamento. Nessa situação, o tempo necessário para reduzir a média de escores das lesões a zero (ponto de cura total da infecção) foi de 20 dias (FIGURA 12). Os primeiros sinais da infecção surgiram por volta do 2º e 3º dias depois da primeira inoculação e as lesões alcançaram seu ponto de infecção máximo por volta do 7º dia. A média de escores das lesões começou a decrescer, como resultado da cura espontânea, por volta do 14º dia. A diferença das curvas estabelecidas pelas médias dos escores de animais inoculados e não inoculados com *T. mentagrophytes* comprovou o estabelecimento da infecção dermatofítica. Esses resultados serviram como base para o planejamento dos próximos experimentos, envolvendo o teste com *Mo*-CBP₄.

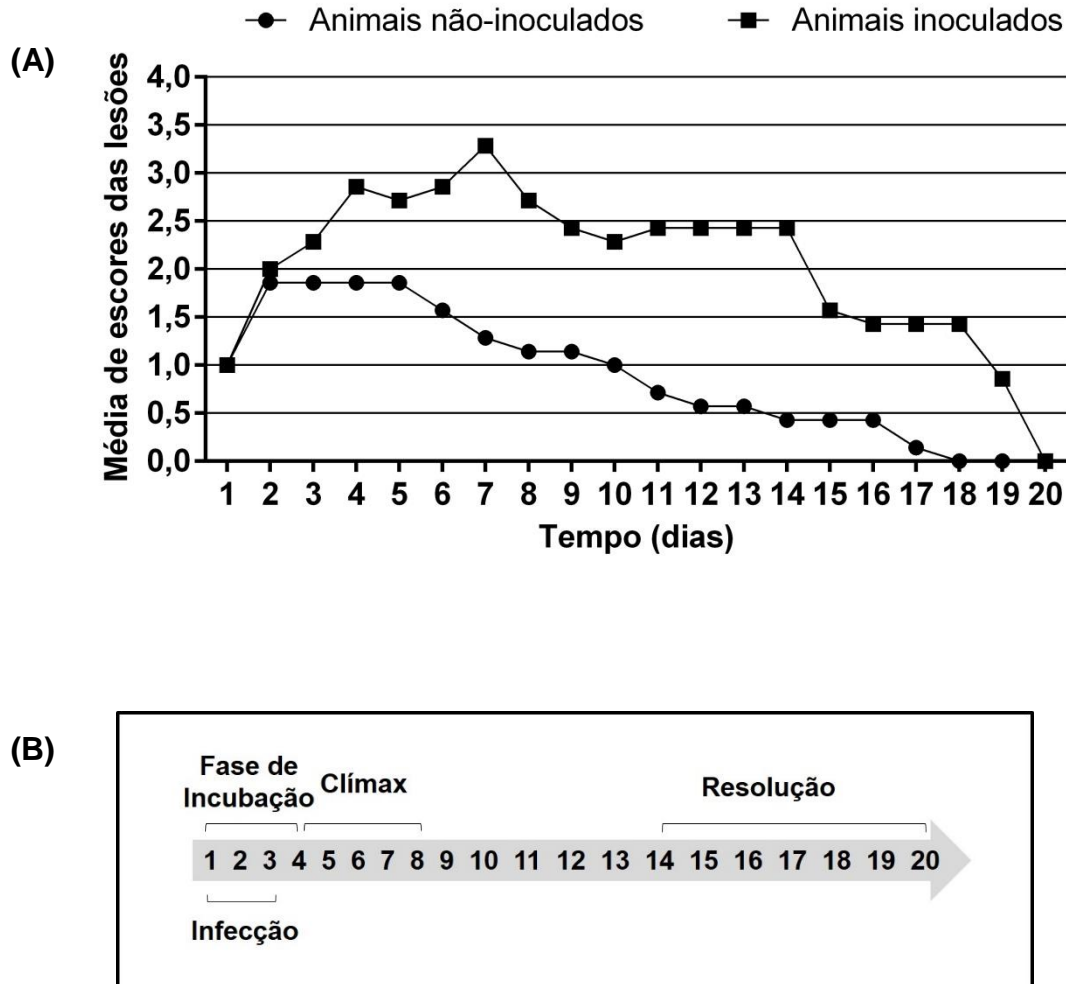
Figura 11 – Efeito de *Mo*-CBP₄ sobre a permeabilidade da membrana de conídios do dermatófito *T. mentagrophytes*



Fonte: Próprio autor.

Fotomicrografia em microscópio óptico (400X) dos conídios de *T. mentagrophytes* na presença de iodeto de propídio (IP), incubados durante 24 horas com salina ou *Mo*-CBP₄ (500 µg/mL). (A) e (B) conídios tratados com salina e visualizados sem e com fluorescência, respectivamente; (C) e (D) conídios tratados com *Mo*-CBP₄ e visualizados sem e com fluorescência, respectivamente. A coloração fluorescente indica entrada do IP, causada pelo aumento da permeabilidade da membrana celular do conídio.

Figura 12 – Curso da infecção causada por *T. mentagrophytes* em modelo de dermatofitose *in vivo* em camundongos



Fonte: Próprio autor.

(A) Curso das lesões causadas pela tricotomização e escarificação, seguida de inoculação ou não da suspensão de conídios (4×10^6 conídios/mL) de *T. mentagrophytes*, na pele de camundongos ($n = 7$), observadas durante 20 dias. Os escores foram obtidos através da metodologia descrita por Ghannoum, Long e Pfister (2008). (B) Painel representativo das diferentes fases, abrangendo desde o início da infecção até a resolução da dermatofitose.

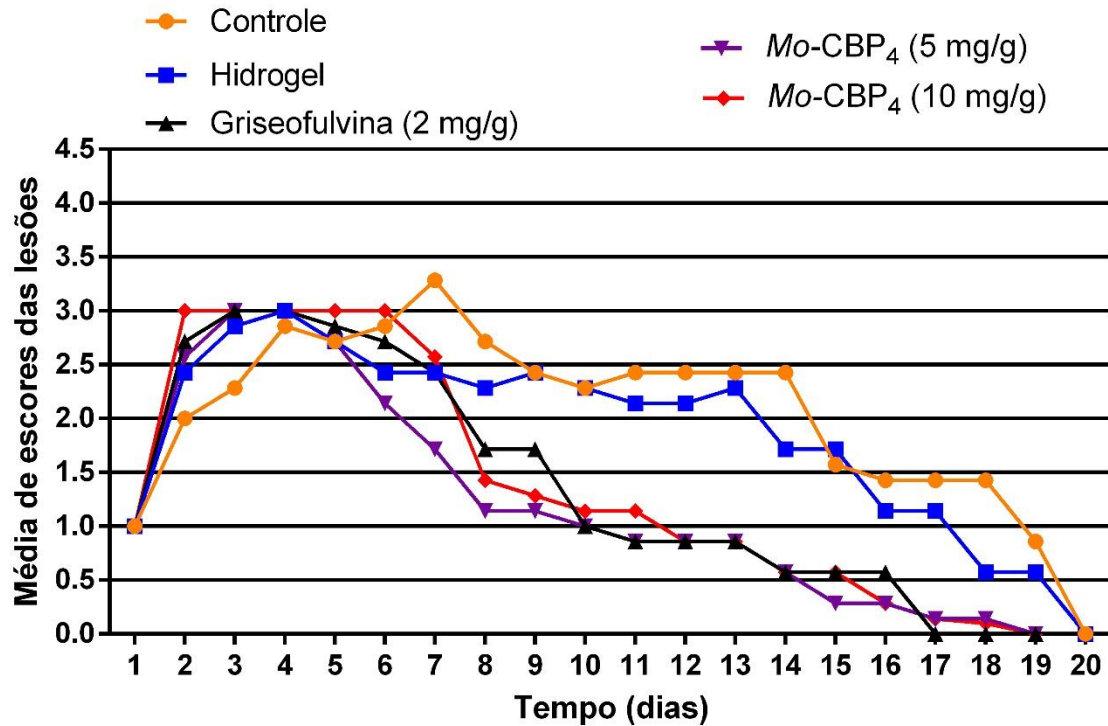
Quando os camundongos inoculados foram tratados com *Mo*-CBP₄ nas doses de 5 e 10 mg/g e comparados com aqueles inoculados com o fungo, mas não tratados com a proteína, foi observada uma diminuição da gravidade das lesões e abreviação do tempo da infecção (FIGURA 13). O início da fase de resolução da infecção em camundongos tratados com *Mo*-CBP₄, independente da dose testada, foi em torno do 8° dia, ou seja, mais cedo em relação ao grupo que não recebeu o tratamento com a proteína teste, cujo início se deu por volta do 14° dia. Esses resultados foram semelhantes aos apresentados pelo fármaco de referência griseofulvina. A completa resolução da infecção nos animais tratados com *Mo*-CBP₄ foi no 19° dia, enquanto que com a griseofulvina foi no 17° dia. Os animais inoculados e tratados apenas com o hidrogel apresentaram curso de infecção semelhante ao dos animais não submetidos ao tratamento com *Mo*-CBP₄.

Quando avaliado o tamanho das lesões causadas pela infecção do *T. mentagrophytes*, *Mo*-CBP₄ se mostrou efetiva em diminuir o dano, com eficácia variando de 34 a 43%, dependendo da dose utilizada. Todavia, essa atividade de *Mo*-CBP₄ não mostrou correlação com a dose usada, visto que o melhor resultado foi alcançado na menor dose testada (5 mg/g). O antifúngico de referência griseofulvina (2 mg/g) mostrou uma eficácia de 34% (TABELA 3). A eficácia de *Mo*-CBP₄ pode ser ainda visualizada na Figura 14, que mostra as imagens das lesões em camundongos no 1°, 7° (clímax) e 12° (período de resolução) dias do período experimental.

Amostras de pele lesionada de camundongos submetidos aos diferentes tratamentos, retirada aos 7 e 20 dias após a inoculação, os quais correspondem aos períodos de clímax e de resolução da infecção no grupo controle, respectivamente, foram cultivadas em meio ágar batata dextrose. Nas placas contendo amostras relativas ao 7° dia após inoculação houve crescimento de colônias de *T. mentagrophytes*, caracterizadas por uma coloração branca, aveludada, pulverulenta, cotonosa e com reverso marrom-amarelado, comprovando a infecção (FIGURA 15). Nas placas contendo amostras provenientes dos animais tratados com *Mo*-CBP₄ (FIGURA 15E-F) ou griseofulvina (FIGURA 15D), o crescimento do fungo foi menor quando comparado com o da amostra oriunda de animais inoculados, mas não tratados (FIGURA 15B). Como esperado, nas placas equivalentes ao 20° dia de

inoculação, crescimento do fungo não foi observado, haja vista estar relacionado ao fim da infecção.

Figura 13 – Curso da infecção causada por *T. mentagrophytes* em camundongos tratados com *Mo*-CBP₄ em diferentes doses



Fonte: Próprio autor.

Camundongos ($n = 7$) foram tricotomizados, escarificados e inoculados com uma suspensão de conídios (4×10^6 conídios/mL) de *T. mentagrophytes*. A partir do quarto dia, os animais foram tratados topicamente com 0,2 g de hidrogel contendo *Mo*-CBP₄ (5 e 10 mg/g) ou griseofulvina (2 mg/g), diariamente, até o final do experimento. Hidrogel foi utilizado como controle negativo. O controle correspondeu aos animais submetidos apenas a inoculação com a suspensão de conídios. Os escores foram obtidos através da metodologia descrita por Ghannoum, Long e Pfister (2008).

Tabela 3 – Eficácia clínica do tratamento com a aplicação tópica de *Mo*-CBP₄ em diferentes concentrações

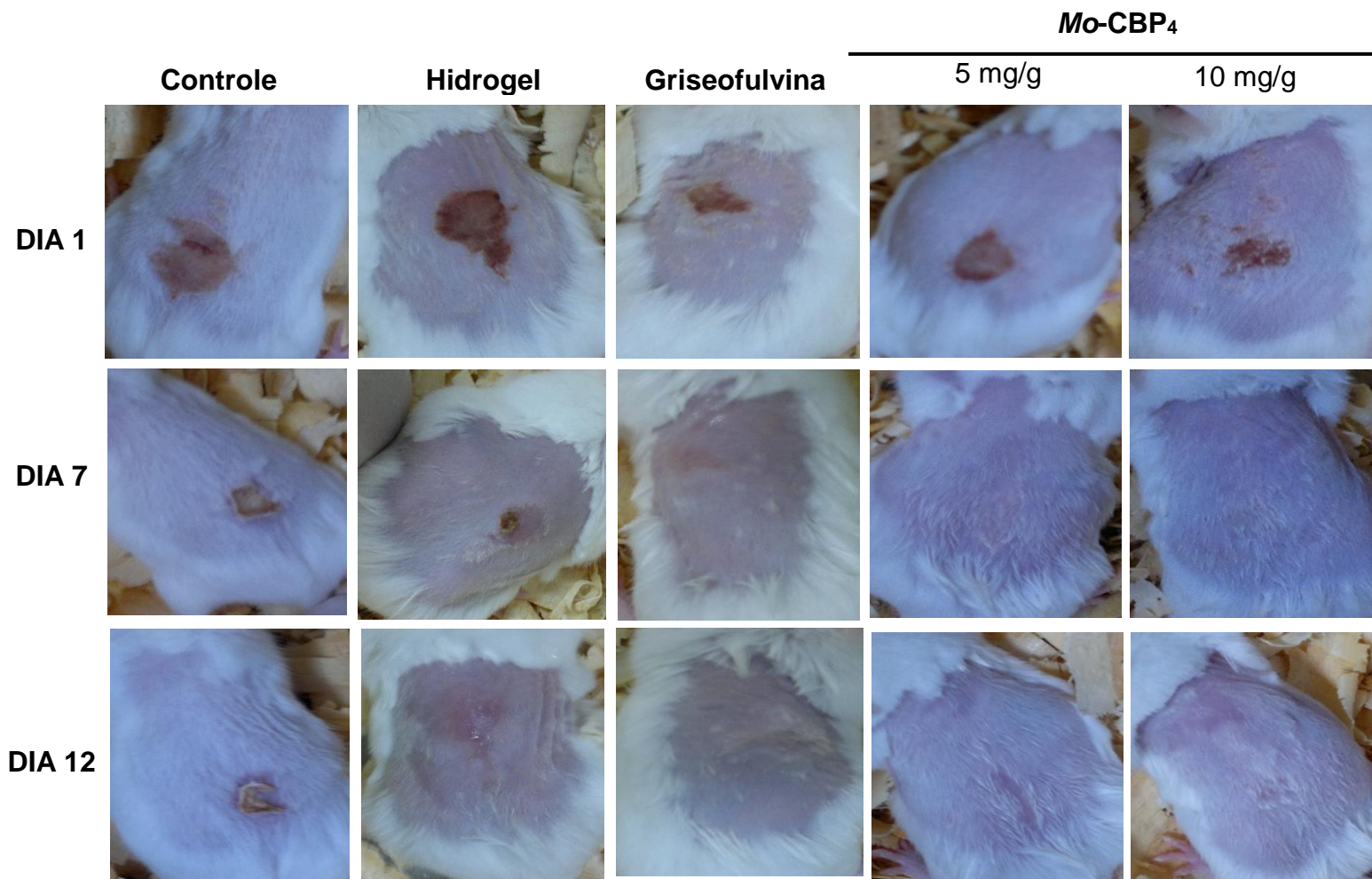
Tratamento	Dose (mg/g)	Soma dos escores^a	Eficácia (%)^b
Controle	-	40,86	-
Hidrogel	-	37,28	9
Griseofulvina	2	26,43	35
<i>Mo</i> -CBP ₄	5	23,43	43
<i>Mo</i> -CBP ₄	10	26,95	34

Fonte: Próprio autor.

^a Os escores foram obtidos através da metodologia descrita por Ghannoum, Long e Pfister (2008);

^b Eficácia foi calculada através da equação: % Eficácia = 100 – (T × 100/C), onde T = soma dos escores do grupo submetido ao tratamento e C = soma dos escores do grupo controle.

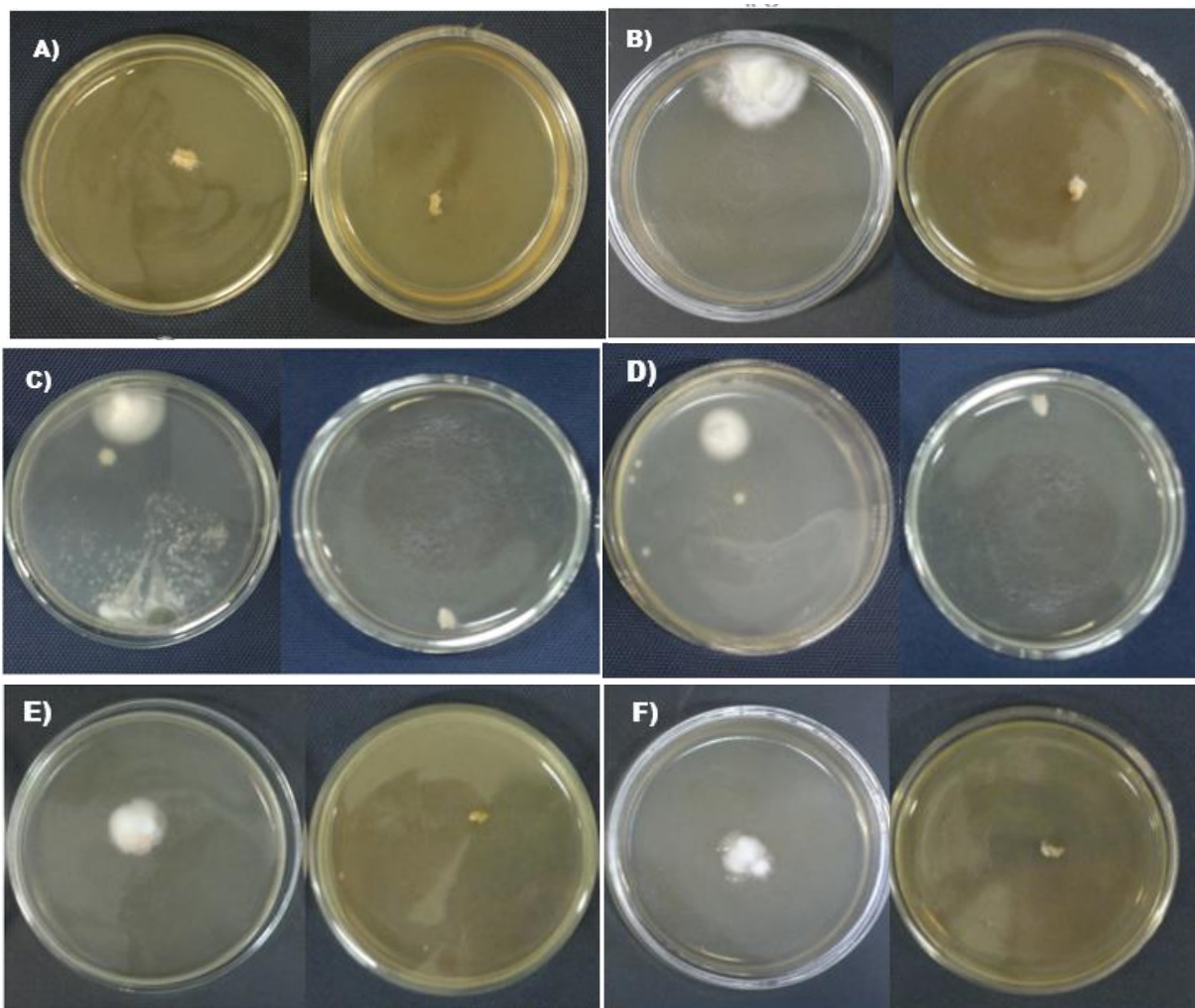
Figura 14 – Imagens das lesões causadas pelo fungo dermatófito *T. mentagrophytes* em pele de camundongos submetidos ou não ao tratamento com *Mo-CBP₄*, obtidas em diferentes dias



Fonte: Próprio autor.

Imagens foram tomadas de cinco animais diferentes (um por grupo) no 1°, 7° (clímax) e 12° (período de resolução) dias do tratamento. O controle correspondeu ao animal submetido apenas a inoculação com a suspensão de conídios.

Figura 15 – Fragmentos de tecidos lesionados de camundongos infectados com *T. mentagrophytes* cultivados em meio ágar batata dextrose



Fonte: Próprio autor.

Fragmentos de pele lesionada oriundos de camundongos no 7° e 20° dia após infecção por *T. mentagrophytes* foram incubados em meio ágar batata dextrose. Cada conjunto de imagens de duas placas representa amostras dos dias 7 e 20, respectivamente, oriundas dos seguintes grupos: (A) animal não inoculado; (B) animal inoculado, porém não tratado; (C) animal inoculado e tratado com o hidrogel; (D) animal inoculado e tratado com griseofulvina (2 mg/g); (E) e (F) animais inoculados e tratados com *Mo-CBP*₄ nas concentrações de 5 e 10 mg/g, respectivamente.

8 DISCUSSÃO

As plantas apresentam-se como uma fonte importante de compostos biologicamente ativos, com potencial para o tratamento de várias doenças, incluindo aquelas infecciosas, sendo necessária a realização de estudos que envolvam aspectos estruturais desses compostos e de seus mecanismos de ação antimicrobiana. Partindo dessa premissa, o presente trabalho objetivou avaliar o potencial antidermatofítico de *Mo-CBP₄*, uma proteína ligante à quitina, isolada por nosso grupo de pesquisa, de sementes de *M. oleifera*.

Inicialmente, procedeu-se com a obtenção e acúmulo de *Mo-CBP₄*, para o uso nos ensaios posteriores, utilizando os mesmos procedimentos de purificação descritos por Pereira (2014). Ao final do processo, foi obtida uma quantidade média de 13,06 mg de *Mo-CBP₄*/g de farinha, representando um rendimento de 6,33% das proteínas do extrato total. Esses resultados foram bastante semelhantes àqueles encontrados pelo protocolo original, mostrando que a purificação foi executada de maneira correta e satisfatória.

Uma vez que *Mo-CBP₄* foi obtida na forma pura e em quantidade satisfatória, seguiu-se a realização dos experimentos para alcançar o objetivo geral desse trabalho, que foi avaliar seu potencial antidermatofítico *in vitro* e *in vivo*. Para tanto, *Mo-CBP₄* teve seu espectro e modo de ação investigados, utilizando cepas clínicas de duas espécies de dermatófitos, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*, sendo utilizada uma cepa para cada espécie. As dermatofitoses estão entre as infecções mais frequentes no mundo e dentre as espécies de dermatófitos existentes, essas espécies sobressaem-se como as causadoras mais comuns dessas doenças de pele. *T. rubrum*, uma espécie antropofílica, é o agente etiológico mais comum, representando entre 80 e 90% dos isolados clínicos, seguida por *T. mentagrophytes*, uma espécie zoofílica, que representa cerca de 11% de tais isolados (SEGAL; FRENKEL, 2015).

Para condução das análises *in vitro*, foi primeiramente realizado um teste de atividade antifúngica contra as cepas de *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*. *Mo-CBP₄*, na concentração de 250 µg/mL, foi capaz de inibir, em cerca de 35%, o crescimento da cepa

de *T. mentagrophytes*. Contudo, mesmo em uma concentração quatro vezes maior (1000 µg/mL), essa proteína não inibiu o crescimento de *T. rubrum*. Atividade antifúngica apresentada por *Mo-CBP₄*, uma proteína ligante à quitina da classe das albuminas 2S (PEREIRA, 2014), apesar de ainda não ter sido estudada, era considerada provável de ocorrer, tendo visto a quantidade de dados na literatura reportando que tanto proteínas ligantes à quitina, quanto proteínas albuminas 2S, se mostram ativas contra fungos patogênicos ao homem (KANOKWIROON *et al.*, 2008; CÂNDIDO *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2011; GOMES *et al.*, 2012).

A maioria das proteínas ligantes à quitina possui um domínio heveínico, encontrado pela primeira vez no peptídeo de 4,7 kDa do látex de *Hevea brasiliensis*, o qual foi chamado de heveína. A atividade antifúngica dessas proteínas está relacionada à capacidade deste domínio de se ligar a quitina presente na parede celular da maioria dos fungos (VAN PARIJS *et al.*, 1991; TRINDADE *et al.*, 2006; YAN *et al.*, 2015). Já as albuminas 2S são proteínas ricas em resíduos de glutamina, relacionadas principalmente à reserva nutricional de plantas e estão presentes nas sementes de mono e dicotiledôneas (YOULE; HUANG, 1981). O modo de ação antifúngico dessas proteínas está relacionado com a interferência na permeabilidade da membrana dos fungos (RIBEIRO *et al.*, 2012). Assim, *Mo-CBP₄* pode estar agindo de duas maneiras principais: ligando-se a quitina da parede celular dos fungos e/ou interferindo na permeabilidade da membrana celular destes. Para ambas as possibilidades, a proteína precisa atravessar as camadas mais externas da parede celular do fungo, constituídas por mananas, proteínas e glucanos.

Muitos estudos vêm sendo realizados com foco nos tipos e quantidades de mananas presentes em diferentes espécies de fungos do gênero *Trichophyton* (BLAKE *et al.*, 1991; IKUTA *et al.*, 1997; PERES *et al.*, 2010; BLUTFIELD *et al.*, 2015). Em alguns destes estudos, concluiu-se que em *T. rubrum*, a camada de mananas encontra-se em maior quantidade do que em *T. mentagrophytes* (IKUTA *et al.*, 1997; PERES *et al.*, 2010). Como no presente estudo temos uma proteína que para exercer sua ação antifúngica provavelmente precisa atravessar esta barreira de mananas, a ausência de ação contra

o *T. rubrum* pode estar relacionada a espessa camada de mananas presente nesta espécie.

Outra explicação para a não inibição de *T. rubrum* por Mo-CBP₄ seria o simples fato de que essa cepa seria mais resistente do que a cepa de *T. mentagrophytes*. Inclusive, a espécie *T. rubrum* tem sido bastante relatada na literatura por ser resistente a inúmeros fármacos de referência. Em 2003, Mukherjee e colaboradores relataram um caso de resistência clínica à terbinafina, uma das drogas mais utilizadas no tratamento de dermatofitoses causadas por *T. rubrum*. A linhagem resistente foi isolada de um paciente com *Tinea unguium*, cujo tratamento por via oral utilizando terbinafina foi ineficaz, mostrando, inclusive, uma resistência cruzada a vários outros inibidores da epoxidase do esqualeno, uma enzima chave na biossíntese de ergosterol, incluindo naftifina, butenafina, tolnaftato e tolclolato. Posteriormente, foi mostrado por Osborne e colaboradores (2005) que essa resistência estava relacionada com uma substituição na sequência de aminoácidos da enzima.

Como Mo-CBP₄ apresentou atividade apenas contra o crescimento de *T. mentagrophytes*, prosseguiu-se com o estabelecimento da concentração inibitória mínima para esta espécie. A CIM₅₀ da proteína foi de 500 µg/mL e a CIM₉₀ maior que 1000 µg/mL. A droga utilizada como referência, a griseofulvina, apresentou CIM₅₀ de 0,156 µg/mL e CIM₉₀ de 0,625 µg/mL, valores próximos aos relatados por Barros, Santos e Hamdan (2007), que encontraram CIM₅₀ e CIM₉₀ de 0,25 e 0,5 µg/mL, respectivamente, para cepas de *T. mentagrophytes*.

Há poucos trabalhos relacionando proteínas antifúngicas e fungos dermatófitos. Uma lectina isolada do cogumelo *Ganoderma lucidum* mostrou atividade antifúngica contra *T. rubrum*, *T. tonsurans* e *T. interdigitale*, apresentando CIM de 65, 20 e 20 µg/mL, respectivamente (GIRJAL; NEELAGUND; KRISHNAPPA, 2011). Mais recentemente, em um estudo abordando a atividade da lectina do líquen *Cladonia verticillaris* (Clavell) contra microrganismos de importância médica, foi mostrado que a proteína era capaz de inibir em 35% o crescimento de *T. rubrum*, atividade que não foi observada contra *T. mentagrophytes* (RAMOS *et al.*, 2014).

A maioria dos estudos envolvendo compostos naturais com atividade antidermatofítica é direcionada a extratos ou metabólitos secundários. É o caso de algumas espécies de algas marrons, onde taninos parecem ser os responsáveis pela atividade inibitória do crescimento de *T. mentagrophytes*. Graciliano e colaboradores (2013), testando a atividade antifúngica das espécies de algas marrons *Cystoseira nodicaulis*, *Cystoseira usneoides* e *Fucus spiralis*, encontraram valores de CIM de 7800, 31300 e 15600 µg/mL, respectivamente. Rahman e colaboradores (2014) mostraram atividade antidermatofítica para *T. mentagrophytes* de um óleo essencial da planta *Lonicera japonica*, com CIM de 500 µg/mL. O extrato etanólico de sementes de *M. oleifera* e suas frações obtidas com acetato de etila e butanol mostraram-se eficazes em inibir o crescimento de *T. mentagrophytes*, apresentando CIM de 2500, 1250 e 2500 µg/mL, respectivamente (CHUANG *et al.*, 2007). Este último trabalho foi encorajado pelo fato das sementes de *M. oleifera* serem utilizadas popularmente em Taiwan e na China para o tratamento de pé-de-atleta ou outras tineas causadas por dermatófitos. O presente trabalho relata, pela primeira vez, uma proteína de sementes de planta com atividade contra fungos dermatófitos do gênero *Trichophyton*.

Após determinação da CIM da proteína em estudo, o próximo passo foi investigar o seu modo de ação antifúngico. Inicialmente, foi testado se *Mo-CBP₄* seria capaz de interferir em diferentes fases do ciclo de vida do fungo: germinação e crescimento micelial. Os resultados mostraram que *Mo-CBP₄* não teve sucesso em inibir o crescimento micelial, nas condições testadas e na concentração de 500 µg/mL. Este fato sugeriu que a atividade antifúngica da proteína provavelmente estaria associada a fase de germinação do fungo, o que foi constatado ao incubar a proteína na mesma concentração (500 µg/mL) com a suspensão de conídios de *T. mentagrophytes*.

A diferença de atividade de *Mo-CBP₄* quanto aos estágios de desenvolvimento do fungo pode estar relacionada à mudança na constituição da parede celular entre conídios e hifas de *T. mentagrophytes*. A parede celular, como já mencionado, é composta por três componentes básicos: manoproteínas, glucanos e quitina. Tanto conídios como hifas possuem esses mesmos componentes, porém o percentual de cada um é diferenciado para estas estruturas (LENG *et al.*, 2008). Em relação ao *T.*

mentagrophytes, já foi relatado que os artroconídios possuem parte de sua composição formada por quitina não-fibrilar, que é um estágio intermediário entre a polimerização de *N*-acetil-D-glucosamina e a cristalização em microfibrilas de quitina. Entretanto, as hifas são formadas apenas por quitina em forma microfibrilar (POLLACK; LANGE; HASHIMOTO, 1983). *Mo*-CBP₃, uma albumina 2S de sementes de *M. oleifera* isolada por nosso grupo de pesquisa também apresentou a mesma diferença de atividade quanto aos estágios de desenvolvimento de *F. solani*, mostrando-se mais eficaz em inibir a germinação do que o crescimento micelial (GIFONI *et al.*, 2012).

Várias proteínas ligantes à quitina possuem atividade antifúngica contra fungos patogênicos ao homem e essa atividade, na maioria das vezes, está relacionada com o sítio de ligação ao carboidrato, no caso a quitina, visto que este carboidrato é um componente estrutural muito importante da parede celular dos fungos (KANOKWIROON *et al.*, 2008; YAO *et al.*, 2010; GOMES *et al.*, 2012). No entanto, *Mo*-CBP₄, não teve sua atividade antifúngica revertida quando incubada com *N*-acetil-D-glucosamina, o que pode ser um indicativo de que o sítio de interação ao carboidrato da proteína não está relacionado com sua atividade antifúngica. Em um experimento semelhante, a atividade antifúngica de *Mo*-CBP₃ também não foi revertida na presença do açúcar específico. Por outro lado, foi verificado que *Mo*-CBP₃ é capaz de inibir apenas fungos que possuem quitina como constituinte de sua parede celular, não tendo inibido a germinação do oomiceto *Pythium oligandrum*, que possui parede celular constituída por celulose no lugar de quitina (GIFONI *et al.*, 2012). Desta maneira, ensaios adicionais se fazem necessários a fim de esclarecer a importância da afinidade por quitina que *Mo*-CBP₄ apresenta para sua atividade antifúngica.

Dando continuidade aos estudos voltados para o conhecimento do modo de ação de *Mo*-CBP₄, seu efeito sobre a permeabilidade da membrana dos conídios foi avaliado. *Mo*-CBP₄ foi capaz de causar um aumento na permeabilidade da membrana do microconídio, permitindo a entrada do iodeto de propídio, evidenciado pela presença de fluorescência, resultante da interação desse composto com o material genético no interior da célula. São vários os exemplos de proteínas da classe das albuminas 2S exercendo esse modo de ação em fungos patogênicos ao homem. Ribeiro e colaboradores (2012)

purificaram uma albumina 2S de sementes de *Passiflora edulis f. flavicarpa* (PfA1b) e testaram sua atividade contra as espécies *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*, tendo sido verificada inibição do crescimento por provável aumento da permeabilidade da membrana plasmática. O mecanismo pelo qual tais proteínas causam aumento da permeabilidade da membrana ainda não está completamente elucidado, mas estudos apontam uma semelhança com o modo de ação das tioninas, sugerindo que as albuminas 2S possam agir através de ligações com receptores específicos, interagindo eletrostaticamente com a bicamada lipídica do fungo através dos fosfolipídeos, causando aumento da permeabilidade e desorganização da membrana. Outra possibilidade seria a interação com glicolipídeos da superfície da membrana do fungo, os quais funcionam como receptores de membrana, levando à formação de poros e influxo e efluxo de íons (PELEGRINI; FRANCO, 2005; OARD, 2011).

Uma classe de moléculas, bastante relatada na literatura, capaz de aumentar a permeabilidade da membrana de fungos e de outros microrganismos são os peptídeos catiônicos. Maurya e colaboradores (2011) descreveram a capacidade do peptídeo catiônico sintético VS3 em aumentar a permeabilidade da membrana plasmática de fungos do gênero *Candida* spp. Harris e colaboradores (2009) também demonstraram propriedades antifúngicas para um peptídeo catiônico, o DsS3(1-16), frente à *Candida albicans*. Segundo esses autores, como esses peptídeos possuem carga líquida positiva, eles interagem com os grupos fosfatos, carregados negativamente, das fosfomananas presentes na camada mais externa da parede celular do fungo. Isso foi comprovado através de cepas mutantes que tiveram sua inibição reduzida pelo decréscimo de fosfomananas e concomitante redução da carga superficial negativa, impedindo a interação do peptídeo. Por conseguinte, sendo *Mo-CBP₄* uma proteína catiônica, é possível que esta possa atuar de maneira similar, interagindo com os grupos fosfatos das fosfomananas da camada mais externa da parede celular do dermatófito, causando sua desestabilização e posterior aumento da permeabilidade da membrana.

Ainda em relação ao modo de ação de *Mo-CBP₄*, foi investigado se essa proteína seria capaz de induzir a produção endógena de espécies reativas de oxigênio (EROs) em microconídios de *T. mentagrophytes*, o que foi confirmado após incubação

da proteína (500 µg/mL) com a suspensão de conídios por 24 horas. Grande parte das proteínas antifúngicas já mencionadas que se mostraram capazes de aumentar a permeabilidade da membrana plasmática também induziram a produção endógena de EROs, sugerindo uma possível relação entre os dois processos (MAURYA *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2012). Por exemplo, o peptídeo catiônico de *Raphanus sativus*, denominado RsAFP2, aumentou a permeabilidade da membrana plasmática e, em seguida, induziu a produção endógena de EROs (AERTS *et al.*, 2007). *Mo*-CBP₄ mostrou uma atuação semelhante à do RsAFP2.

Parece que as proteínas ligantes à quitina de sementes de *M. oleifera* agem de maneira semelhante para inibir o desenvolvimento de fungos. *Mo*-CBP₃ mostrou atividade antifúngica frente aos fitopatógenos *F. solani*, *F. oxysporum*, *C. musae* e *C. gloesporioides* e, em um estudo mais aprofundado utilizando *F. solani* como modelo, foi verificado que *Mo*-CBP₃ causava aumento da permeabilidade da membrana celular, interferindo nas bombas de H⁺-ATPase e induzindo a formação endógena de EROs (GIFONI *et al.*, 2012; BATISTA *et al.*, 2014). A proteína ligante à quitina *Mo*-CBP₂ apresentou atividade inibitória do crescimento de *C. albicans*, aumentando a permeabilidade da membrana e induzindo estresse oxidativo (SILVA NETO, 2015).

Uma vez constatada a atividade antidermatofítica *in vitro* de *Mo*-CBP₄, o próximo passo foi propor uma formulação tópica contendo a proteína e testá-la em modelo de dermatofitose *in vivo*. Para isso, foram realizados testes preliminares visando o estabelecimento do protocolo de infecção em camundongos. Na literatura, estão disponíveis vários protocolos de dermatofitose em murinos. Os modelos iniciais foram propostos por Odds e colaboradores (2004), estudando o potencial antidermatofítico do agente antifúngico triazol R126638, *in vitro* e *in vivo*. Nesse estudo, foram usados camundongos fêmeas imunossuprimidos previamente com injeção subcutânea de valerato de estradiol por 4 dias. A suspensão de conídios de *T. mentagrophytes* foi inoculada em escarificações da pele dos animais e a análise clínica realizada estabelecendo-se escores de acordo com a evolução da infecção. Porém, um estudo realizado por Sharma, Kumar e Joshi (2011) mostrou que a imunossupressão prévia dos animais não era um passo essencial para o estabelecimento da doença. Assim, no

presente estudo, não foi procedida a imunossupressão prévia dos animais para o modelo de infecção por dermatófito.

Na avaliação aqui conduzida, camundongos fêmeas foram submetidas à tricotomização e, para facilitar a infecção pelo fungo, foram realizadas leves escarificações. A suspensão de conídios de *T. mentagrophytes* foi aplicada durante os três primeiros dias do experimento. No 7º dia, foi observado o clímax da infecção, caracterizado por vermelhidão, perda de pelos, descamação e áreas ulceradas. As lesões não foram visualizadas nos animais não inoculados. A viabilidade do inóculo foi avaliada cultivando-o em meio BDA. Vinte dias após o início do experimento, os animais encontravam-se totalmente curados. A instalação da infecção nos camundongos foi possível tendo em vista que *T. mentagrophytes* se caracteriza como uma espécie antropofílica e zoofílica, causando infecção também em animais. Recentemente, foi estabelecido um protocolo experimental de dermatofitoses causadas pelo fungo antropofílico *T. rubrum* (MEI *et al.*, 2015).

No modelo de infecção estabelecido por Sharma, Kumar e Joshi (2011), a aplicação do inóculo foi realizada apenas no primeiro dia do experimento e este encontrava-se em uma concentração de 1×10^6 conídios/mL. No presente estudo, foi necessária a aplicação do inóculo nos três primeiros dias do experimento, na concentração 4 vezes maior de conídios, para que a infecção fosse estabelecida. Diferenças de virulência entre cepas de espécies de *T. mentagrophytes*, bem como das condições dos animais utilizados, podem ser motivos para a não reprodução do protocolo citado.

O tempo de curso clínico da infecção causada por *T. mentagrophytes* em camundongos no presente estudo foi de 20 dias, ou seja, ao fim deste período os animais se restabeleceram por completo, naturalmente. A instalação da infecção ficou comprovada quando os animais inoculados foram comparados com os animais não inoculados; estes últimos conseguiram se restabelecer por volta do 18º dia, apresentando lesões com um grau de severidade bem menor.

Uma vez que o tempo de curso e a severidade da infecção foram determinados, *Mo-CBP₄* foi testada nas doses de 5 e 10 mg/g. A formulação escolhida

para administração da proteína foi o hidrogel, pois evitava o seu escoamento pela pele do animal, mantendo o contato da amostra com a lesão. Para formulação do hidrogel foi utilizado o espessante hidroxietilcelulose, comercialmente chamado de natrosol. Este composto foi escolhido por sua característica não iônica, pois em veículos com carga, poderia haver alguma interação com *Mo*-CBP₄ (uma proteína catiônica) e, assim, atrapalhar sua liberação. Ao final da preparação, o hidrogel de *Mo*-CBP₄ apresentou-se como um gel transparente incolor. Griseofulvina, a droga de referência, foi utilizada na dose de 2 mg/g, conforme estabelecida por Aggarwal, Goindi e Khurana (2013), quando avaliaram e otimizaram formulações tópicas desse antifúngico. As doses escolhidas para a proteína foram maiores que a da griseofulvina levando em consideração os resultados obtidos nos ensaios *in vitro*, nos quais a droga de referência apresentou CIM menor que *Mo*-CBP₄.

Os resultados encontrados para o grupo tratado somente com o hidrogel mostram que este se trata de um veículo praticamente inerte, interferindo levemente na gravidade da lesão e em nada no tempo de curso da infecção. A proteína, no entanto, mostrou-se efetiva nas doses utilizadas, não se comportando de forma dose dependente. *Mo*-CBP₄ abreviou o tempo de curso da doença para o 19º dia e amenizou a gravidade das lesões. Esse resultado, de certa forma, confirma os dados dos ensaios de atividade *in vitro*, onde foi observado que *Mo*-CBP₄ não afeta o crescimento micelial, agindo principalmente sobre a germinação dos conídios. Assim, uma vez que *Mo*-CBP₄ não abreviou significativamente a infecção, acredita-se que a proteína agiu inibindo a germinação dos novos conídios formados ao longo da infecção, fornecendo suporte para que o sistema imune do animal combatesse o micélio já crescido. Logo, a proposta é que *Mo*-CBP₄ age controlando a infecção.

Como dito anteriormente, há poucos trabalhos abordando propriedades antifúngicas de proteínas contra fungos dermatófitos e isso se repete em estudos com modelos de dermatofitoses animais que, em sua maioria, envolvem a avaliação tópica de outros tipos de compostos com atividade antidermatofítica como extratos vegetais, metabólitos secundários ou produtos sintéticos. É o caso de uma espécie de planta daninha, onde flavonoides, presentes no extrato das raízes, parecem ser os responsáveis

pela atividade antidermatofítica contra *T. mentagrophytes*. Sharma, Kumar e Joshi (2011), analisando a atividade antifúngica da espécie de planta daninha *Lantana camara*, em modelo experimental de dermatofitose induzida em camundongos, verificaram que, nos animais cujas lesões foram tratadas com o extrato, houve uma redução de até 14 dias no tempo de infecção, na maior dose testada, e que não houve qualquer recorrência das lesões provocadas pela doença. Além disso, relataram que o extrato não apresentou nenhum tipo de efeito colateral. Gasparto e colaboradores (2015) mostraram que o composto químico 2-(benzilidenoamino)fenol apresentou atividade antidermatofítica contra *T. rubrum*, também em modelo de dermatofitose induzida em camundongos, mostrando-se bastante eficiente, reduzindo a carga fúngica da pele dos animais tratados com o composto. Long, Hager e Ghannoum (2016) relataram também um outro composto químico com atividade antidermatofítica contra *T. mentagrophytes*, porém em modelo experimental de dermatofitose induzida em porquinho da Índia. O trabalho mostrou que o composto 2-(3,5-Dimetil-1H-pirazol-1-il)-5-metilfenol foi bastante eficiente no combate à infecção, apresentando eficácia clínica superior à da droga padrão utilizada (46,9% e 25%, respectivamente).

Ainda em relação aos testes *in vivo* com *Mo*-CBP₄, deve ser ressaltado que os resultados obtidos para *Mo*-CBP₄ (5 mg/g) e griseofulvina (2 mg/g) foram semelhantes, apresentando eficácia de 43% e 35% respectivamente, apesar de ter sido usada uma dose da proteína teste apenas ligeiramente maior do que a da droga de referência. Este resultado não condiz com a grande diferença encontrada nos ensaios *in vitro*, em relação às CIM de *Mo*-CBP₄ e griseofulvina. Isso, talvez, possa ser justificado pelas propriedades farmacológicas adicionais inerentes a *Mo*-CBP₄. Estudos anteriores mostraram atividade anti-inflamatória de *Mo*-CBP₄ em ensaios de contorção abdominal causada por ácido acético e na peritonite induzida por zymosan, ambos em camundongos. A proteína foi capaz de diminuir a migração neutrofílica em um processo inflamatório agudo, além de diminuir a citocina pró-inflamatória IL-1 e aumentar a interleucina anti-inflamatória (IL-10) no soro dos animais (PEREIRA *et al.*, 2011; PEREIRA, 2014). Sabendo-se que a infecção causada por *T. mentagrophytes* é caracterizada pela indução da expressão de citocinas pelos queratinócitos da pele, desencadeando uma resposta inflamatória (SHIRAKI *et al.*,

2006), *Mo-CBP₄*, além de atividade antifúngica, pode estar amenizando a inflamação local, diminuindo os sinais clínicos e abreviando a infecção. Estudos posteriores podem ser realizados para investigar a participação da atividade anti-inflamatória de *Mo-CBP₄* em modelo de dermatofitose, dosando citocinas e investigando a migração neutrofílica no local da infecção.

Com base nos resultados obtidos nos ensaios *in vitro* e *in vivo*, *Mo-CBP₄* se apresenta como um promissor composto natural a ser utilizado no tratamento de dermatofitose causada por *T. mentagrophytes*, podendo ser alvo de estudos posteriores visando a elucidação do mecanismo de ação e de possíveis alterações imunológicas causadas pela infecção.

9 CONCLUSÃO

Mo-CBP₄, uma proteína ligante à quitina purificada de sementes de *M. oleifera*, apresentou atividade antifúngica *in vitro* espécie-específica, inibindo a germinação do conídio, mas não o crescimento micelial, do dermatófito *Trichophyton mentagrophytes*, provavelmente através do aumento da permeabilidade da membrana plasmática e da indução da produção endógena de espécies reativas de oxigênio. A atividade antidermatofítica de *Mo*-CBP₄ contra *T. mentagrophytes* foi confirmada em modelo de dermatofitose em animal, diminuindo a gravidade das lesões e abreviando o tempo de infecção. Esses dados demonstram o potencial de *Mo*-CBP₄ como um promissor composto natural a ser utilizado no tratamento de dermatofitoses causadas por *T. mentagrophytes*.

REFERÊNCIAS

ACHTERMAN, R.R.; WHITE, T.C. Dermatophyte Virulence Factors: Identifying and Analyzing Genes That May Contribute to Chronic or Acute Skin Infections. **International Journal of Microbiology**, 2012.

AERTS, A.M.; FRANÇOIS, I.E.J.A.; MEERT, E.M.K.; LI, Q.T.; CAMMUE, B.P.A.; THEVISSSEN, K. The Antifungal Activity of RsAFP2, a Plant Defensin from *Raphanus sativus*, Involves the Induction of Reactive Oxygen Species in *Candida albicans*. **Journal of Molecular Microbiology Biotechnology**, v. 13, p. 243-247, 2007.

AGGARWAL, N.; GOINDI, S.; KHURANA, R. Formulation, characterization and evaluation of an optimized microemulsion formulation of griseofulvin for topical application. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 105, p. 158-166, 2013.

AGIZZIO, A.P.; CUNHA, M.; CARVALHO, A.O.; OLIVEIRA, M.A.; RIBEIRO, S.F.F.; GOMES, V.M. The antifungal properties of a 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds involve plasma membrane permeabilization and ultrastructural alterations in yeast cells. **Plant Science**, v. 171, p. 515-522, 2006.

AJELLO, L. Present day concepts in the dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 17, p. 315-324, 1962.

ANWAR, F.; LATIF, S.; ASHRAF, M.; GILANI, A.H. *Moringa oleifera*: A Food Plant with Multiple Medicinal Uses. **Phytotherapy research**, v. 21, p. 17-25, 2007.

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

BARROS, M.E.S.; SANTOS, D.A.; HAMDAN, J.S. Evaluation of susceptibility of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* clinical isolates to antifungal drugs using a modified CLSI microdilution method (M38-A). **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 514-518, 2007.

BATISTA, A.B.; OLIVEIRA, J.T.A.; GIFONI, J.M.; PEREIRA, M.L.; ALMEIDA, M.G.G.; GOMES, V.M.; CUNHA, M.; RIBEIRO, S.F.F.; DIAS, G.B.; BELTRAMI, L.M.; LOPES, J.L.S.; GRANGEIRO, T.B.; VASCONCELOS, I.M. New Insights into the Structure and Mode of Action of Mo-CBP₃, an Antifungal Chitin-Binding Protein of *Moringa oleifera* Seeds. **Plos one**, v. 9, 2014.

BLAKE, J.S.; DAHL, M.V.; HERRON, M.J.; NELSON, R.D. An Immunoinhibitory cell wall glycoprotein (mannan) from *Trichophyton rubrum*. **The journal of investigative dermatology**, v. 96, p. 657-661, 1991.

BLUTFIELD, M.S.; LOHRE, J.M.; PAWICH, D.A.; VLAHOVIC, T.C. The Immunologic Response to *Trichophyton Rubrum* in Lower Extremity Fungal Infections. **Journal of Fungi**, v. 1, p. 130-137, 2015.

BORRIS, R.P. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, p. 29-38, 1996.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BROEKAERT, W.F.; PARIJS, J.V.; LEYNS, F.; JOOS, H.; PEUMANS, W.J. A Chitin-Binding Lectin from Stinging Nettle Rhizomes with Antifungal Properties. **Science**, v. 245, p. 1100-1102, 1989.

CÂNDIDO, E.S.; PINTO, M.F.S.; PELEGRINI, P.B.; LIMA, T.B.; SILVA, O.N.; POGUE, R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; FRANCO, O.L. Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. **The FASEB Journal**, v. 25, p. 3290-3305, 2011.

CERVELATTI, E.P.; FACHIN, A.L.; FERREIRA-NOZAWA, M.S.; MARTINEZ-ROSSI, N.M. Molecular cloning and characterization of a novel ABC transporter gene in the human pathogen *Trichophyton rubrum*. **Medical Mycology**, v. 44, p. 141-147, 2006.

CHUANG, P.H.; LEE, C.W.; CHOU, J.Y.; MURUGAN, B.; SHIEH, B.J.; CHEN, H.M. Antifungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 232-236, 2007.

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

COELHO, R. C. **Análise toxicológica e avaliação da estabilidade de uma proteína ligante à quitina isolada de sementes de *Moringa oleifera* como perspectiva de sua utilização como um biofármaco**. Monografia (Bacharelado em Biologia) - Universidade Federal do Ceará, 2013.

DEGREEF, H. Clinical Forms of Dermatophytosis (Ringworm Infection). **Mycopathologia**, v. 166, p. 257-265, 2008.

DHAYANITHI, N.B.; KUMAR, T.T.A.; KALAISELVAM, M.; BALASUBRAMANIAN, T.; SIVAKUMAR, N. Anti-dermatophytic activity of marine sponge, *Sigmadocia carnos* (Dendy) on clinically isolated fungi. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, p. 635-639, 2012.

DIAS, M.F.R.G.; BERNARDES-FILHO, F.; SCHECHTMAN, R.C.; QUARESMA-SANTOS, M.V.P.; AMORIM, A.G.F.; AZULAY, D.R. Update on therapy for superficial mycoses: review article part I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 88, p. 764-774, 2013.

DIAS, M.F.R.G.; BERNARDES-FILHO, F.; SCHECHTMAN, R.C.; QUARESMA-SANTOS, M.V.P.; AMORIM, A.G.F.; AZULAY, D.R. Treatment of superficial mycoses: review - part II. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 88, p. 937-944, 2013.

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

DUEK, L.; KAUFMAN, G.; ULMAN, Y.; BERDICEVSKY, I. The pathogenesis of dermatophyte infections in human skin sections. **Journal of Infection**, v. 48, p. 175-180, 2004.

EILERT, U.; WOLTERS, B.; NAHRSTEDT, A. The antibiotic principle of seeds of *Moringa oleifera* and *Moringa stenopetala*. **Planta Medica**, v. 42, p. 55–61, 1981.

ELEWSKI, B.E. Onychomycosis: Pathogenesis, Diagnosis, and Management. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, p. 415-429, 1998.

ELEWSKI, B.E.; OHIO, M.D.C. Mechanisms of action of systemic antifungal agents. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 28, p. 28-34, 1993.

ESPINEL-INGROFF, A.; BARTLETT, M.; BOWDEN, R.; CHIN, N.X.; COOPER, JR.C.; FOTHERGILL, A.; MCGINNIS, M.R.; MENEZES, P.; MESSER, S.A.; NELSON, P.W.; ODDS, F.C.; PASARELL, L.; PETER, J.; PFALLER, M.A.; REX, J.H.; RINALDI, M.G.; SHANKLAND, G.S.; WALSH, T.J.; WEITZMAN, I. Multicenter Evaluation of Proposed Standardized Procedure for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. **Journal of clinical microbiology**, v. 35, p. 139-143, 1997.

ESQUENAZI, D.; ALVIANO, C.S.; 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, p. 144-153, 2004.

EZEAMUZLE, I.C.; AMBADEDEROMO, A.W.; SHODE, F.O.; EKWEBELEM, S.C. Anti-inflammatory effects of *Moringa oleifera* root extract. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 34, p. 207–212, 1996.

FACHIN, A.L.; CONTEL, E.P.B.; MARTINEZ-ROSSI, N.M. Effect of sub-MICs of antimycotics on expression of intracellular esterase of *Trichophyton rubrum*. **Medical Mycology**, v. 39, p. 129-133, 2001.

FACHIN, A.L.; FERREIRA-NOZAWA, M.S.; MACCHERONI, W.; MARTINEZ-ROSSI, N.M. Role of the ABC transporter TruMDR2 in terbinafine, 4-nitroquinoline N-oxide and ethidium bromide susceptibility in *Trichophyton rubrum*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 1093-1099, 2006.

FAIZI, S.; SIDDIQUI, B.S.; SALEEM, R.; SIDDIQUI, S.; AFTAB, K.; GILANI, A.H. Fully acetylated carbonate and hypotensive thiocarbamate glycosides from *Moringa oleifera*. **Phytochemistry**, v. 38, p. 957-963, 1995.

FERREIRA, P.M.P.; FARIAS, D.F.; OLIVEIRA, J.T.A.; CARVALHO, A.F.U. *Moringa oleifera*: bioactive compounds and nutritional potential. **Revista de Nutrição**, v. 21, p. 431-437, 2008.

FRASER, R.D.B.; PARRY, D.A.D. The three-dimensional structure of trichocyte (hard α -) keratin intermediate filaments: Features of the molecular packing deduced from the sites of induced crosslinks. **Journal of Structural Biology**, v. 151, p. 171-181, 2005.

GASPARTO, A.K.; BALTAZAR, L.M.; GOUVEIA, L.F.; SILVA, C.M.; BYRRO, R.M.D.; RACHID, M.A.; JÚNIOR, A.S.C.; RESENDE-STOIANOFF, M.A.; FÁTIMA, A.; SANTOS, D.A. 2-(Benzylideneamino)phenol: A promising hydroxyaldimine with potent activity against dermatophytosis. **Mycopathologia**, v. 179, p. 243-251, 2015.

GEORGOPAPADAKOU, N.H. Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, 547-557, 1998.

GHANNOUM, M.A.; HOSSAIN, M.A.; LONG, L.; MOHAMED, S.; REYES, G.; MUKHERJEE, P.K. Evaluation of Antifungal Efficacy in an Optimized Animal Model of *Trichophyton mentagrophytes*-Dermatophytosis. **Journal of Chemotherapy**, v. 16, p. 139-144, 2004.

GHANNOUM, M.A.; LONG, L.; PFISTER, W. R. Determination of the efficacy of terbinafine hydrochloride nail solution in the topical treatment of dermatophytosis in a guinea pig model. **Mycoses**, v. 52, p. 35-43, 2008.

GIFONI, J.M.; OLIVEIRA, J.T.A.; OLIVEIRA, H.D.; BATISTA, A.B.; PEREIRA, M.L.; GOMES, A.S.; OLIVEIRA, H.P.; GRANGEIRO, T.B.; VASCONCELOS, I.M. A Novel Chitin-Binding Protein from *Moringa oleifera* Seed with Potential for Plant Disease Control. **Peptide Science**, v. 98, p. 406-415, 2012.

GIRJAL, V.U.; NEELAKUND, S.; KRISHNAPPA, M. *Ganoderma lucidum*: a source for novel bioactive lectin. **Protein & Peptide Letters**, v. 18, p. 1150-1157, 2011.

GOMES, F.S.; PROCÓPIO, T.F.; NAPOLEÃO, T.H.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, p. 672-679, 2012.

GRACILIANO, L.; PINTO, E.; ANDRADE, P.B.; VALENTÃO, P. Antifungal Activity of Phlorotannins against Dermatophytes and Yeasts: Approaches to the Mechanism of Action and Influence on *Candida albicans* Virulence Factor. **Plos one**, v. 8, 2013.

GRÄSER, Y.; SCOTT, J.; SUMMERBELL, R. The new species concept in dermatophytes – a polyphasic approach. **Mycopathologia**, v. 166, p. 239-256, 2008.

GUPTA, A.K.; AHMAD, I.; PORRETA, M.; SUMMERBELL, R.C. Arthroconidial formation in *Trichophyton raubitschekii*. **Mycoses**, v. 46, p. 304-310, 2003.

GUPTA, A.K.; COOPER, E.A. Update in Antifungal Therapy of Dermatophytosis. **Mycopathologia**, v. 166, p. 353-367, 2008.

HARRIS, M.; MORA-MONTES, H.M.; GOW, N.A.R.; COOTE, P.J. Loss of mannosylphosphate from *Candida albicans* cell wall proteins results in enhanced resistance to the inhibitory effect of a cationic antimicrobial peptide via reduced peptide binding to the cell surface. **Microbiology**, v. 155, p. 1058-1070, 2009.

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

HAYES, B.M.E.; BLEACKLEY, M.R.; WILTSHIRE, J.L.; ANDERSON, M.A.; TRAVEN, A.; VAN DER WEERDEN, N.L. Identification and Mechanism of Action of the Plant Defensin NaD1 as a New Member of the Antifungal Drug Arsenal against *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, p. 3667-3675, 2013.

HAYES, J.D.; WOLF, C.R. Molecular mechanisms of drug resistance. **Biochemical Journal**, v. 272, p. 281-295, 1990.

HAYETTE, M.P.; SACHELI, R. Dermatophytosis, Trends in Epidemiology and Diagnostic Approach. **Current Fungal Infection Reports**, v. 9, p. 164-179, 2015.

IKUTA, K.; SHIBATA, N.; BLAKE, J.S.; DAHL, M.V.; NELSON, R.D.; HISAMICHI, K.; KOBAYASHI, H.; SUZUKI, S.; OKAWA, Y. NMR study of the galactomannans of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. **Biochemical Journal**, v. 323, p. 297-305, 1997.

ILKIT, M.; DURDU, M. *Tinea pedis*: The etiology and global epidemiology of a common fungal infection. **Critical Reviews Microbiology**, v. 41, p. 374-388, 2015.

IROBI, O.N.; DARAMOLA, S.O. Antifungal activities of crude extracts of *Mitracarpus villosus* (Rubiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 40, p. 137-140, 1993.

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

KANOKWIROON, K.; TEANPAISAN, R.; WITITSUWANNAKUL, D.; HOOPER, A.B.; WITITSUWANNAKUL, R. Antimicrobial activity of a protein purified from the latex of *Hevea brasiliensis* on oral microorganisms. **Mycoses**, v. 51, p. 301-307, 2008.

KARIMI, I.; MIKAEILI, A. **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education**. Chapter: Animal Models as Tools for Translational Research: Focus on Dermatophytosis. 4. ed. Badajoz, Espanha: Formatex, v. 3, p. 1448-1454, 2013.

KAUFMAN, G.; HORWITZ, B.A.; DUEK, L.; ULLMAN, Y.; BERDICEVSKY, I. Infection stages of the dermatophyte pathogen *Trichophyton*: microscopic characterization and proteolytic enzymes. **Medical Mycology**, v. 45, p. 149-155, 2007.

KLAFKE, G.B.; MOREIRA, G.M.S.G.; MONTE, L.G.; PEREIRA, J.L.; BRANDOLT, T.M.; XAVIER, M.O.; SANTI-GADELHA, T.; DELLAGOSTIN, O.A.; PINTO, L.S. Assessment of Plant Lectin Antifungal Potential Against Yeasts of Major Importance in Medical Mycology. **Mycopathologia**, v. 175, p. 147-151, 2013.

KOO, J.C.; LEE, B.; YOUNG, M.E.; KOO, S.C.; COOPER, J.A.; BAEK, D.; LIM, C.O.; LEE, S.Y.; YUN, D.J.; CHO, M.J. Pn-AMP1, a Plant Defense Protein, Induces Actin Depolarization in Yeasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 45, p. 1669-1680, 2004.

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

LECHA, M.; EFFENDY, I.; CHAUVIN, M.F.; CHIACCHIO, N.D.; BARAN, R. Treatment options – development of consensus guidelines. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 19, p. 25-33, 2005.

LEE, J.R.; LEE, S.S.; PARK, S.C.; KANG, J.S.; KIM, S.Y.; LEE, K.O.; LEE, S.Y. Functional characterization of pathogen-responsive protein AtDabb1 with an antifungal activity from *Arabidopsis thaliana*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1784, p. 1918-1923, 2008.

LENG, W.; LIU, T.; LI, R.; YANG, J.; WEI, C.; ZHANG, W.; JIN, Q. Proteomic profile of dormant *Trichophyton Rubrum* conidia. **BMC Genomics**, v. 9, p. 303-313, 2008.

LENG, W.; LIU, T.; WANG, J.; LI, R.; JIN, QI. Expression dynamics of secreted protease genes in *Trichophyton rubrum* induced by key host's proteinaceous components. **Medical Mycology**, v. 47, p. 759-765, 2009.

LONG, L.; HAGER, C.; GHANNOUM, M. Evaluation of the efficacy of ME1111 in the topical treatment of dermatophytosis in a guinea pig model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, p. 2343-2345, 2016.

MARANHÃO, F.C.A.; PAIÃO, F.G.; FACHIN, A.L.; MARTINEZ-ROSSI, M.N. Membrane transporter proteins are involved in *Trichophyton rubrum* pathogenesis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 163-168, 2009.

MARTINEZ, D.A.; OLIVER, B.G.; GRÄSER, Y.; GOLDBERG, J.M.; LI, W.; MARTINEZ-ROSSI, N.M.; MONOD, M.; SHELEST, E.; BARTON, R.C.; BIRCH, E.; BRAKHAGE, A.A.; CHEN, Z.; GURR, S.J.; HEIMAN, D.; HEITMAN, J.; KOSTI, I.; ROSSI, A.; SAIF, S.; SAMALOVA, M.; SAUNDERS, C.W.; SHEA, T.; SUMMERBELL, R.C.; XU, J.; YOUNG, S.; ZENG, Q.; BIRREN, B.W.; CUOMO, C.A.; WHITE, T.C. Comparative Genome Analysis of *Trichophyton rubrum* and Related Dermatophytes Reveals Candidate Genes Involved in Infection. **mBio**, v. 3, 2012.

MARTINEZ-ROSSI, N.M.; PERES, N.T.A.; ROSSI, A. Antifungal Resistance Mechanisms in Dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 166, p. 369-383, 2008.

MAURYA, I.K.; PATHAK, S.; SHARMA, M.; SANWAL, H.; CHAUDHARY, P.; TUPE, S.; DESHPANDE, M.; CHAUHAN, V.S.; PRASAD, R. Antifungal activity of novel synthetic peptides by accumulation of reactive oxygen species (ROS) and disruption of cell wall against *Candida albicans*. **Peptides**, v. 32, p. 1732-1740, 2011.

MBIKAY, M. Therapeutic potential of *Moringa oleifera* leaves in chronic hyperglycemia and dyslipidemia: a review. **Frontiers in pharmacology**, v. 3, 2012.

MEI, Y.X.; DAI, X.Y.; YANG, W.; XU, X.W.; LIANG, Y.X. Antifungal activity of chitooligosaccharides against the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 77, p. 330-335, 2015.

MENDIETA, J.R.; PAGANO, M.R.; MUÑOZ, P.F.; DALEO, G.R.; GUEVARA, M.G. Antimicrobial activity of potato aspartic proteases (StAPs) involves membrane permeabilization. **Microbiology**, v. 152, p. 2039-2047, 2006.

MOHAMEDY, E.; ABDALLA, A.M. Evaluation of antifungal activity of *Moringa oleifera* extracts as natural fungicide against some plant pathogenic fungi *in-vitro*. **Journal of Agricultural Technology**, v. 10, p. 963-982, 2014.

MORIARTY, B.; HAY, R.; MORRIS-JONES, R. The diagnosis and management of tinea. **British Medical Journal**, 2012.

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, p. 82-86, 2003.

MURAKAMI, A.; KITAZONO, Y.; JIWAJINDA, S.; KOSHIMIZU, K.; OHIGASHI, H. Niaziminin, a thiocarbamate from the leaves of *Moringa oleifera*, holds a strict structural requirement for inhibition of tumor-promoter-induced Epstein–Barr virus activation. **Planta Medica**, v. 64, p. 319–323, 1998.

NENOFF, P.; KRÜGER, C.; GINTER-HANSELMAYER, G.; TIETZ, H.J. Mycology – an update. Part 1: Dermatomycoses: Causative agents, epidemiology and pathogenesis. **Journal of the German Society of Dermatology**, v. 12, p. 188-210, 2014.

OARD, S.V. Deciphering a mechanism of membrane permeabilization by α -hordothionin peptide. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1808, p. 1737-1745, 2011.

ODDS, F.; AUSMA, J.; GERVEN, F.V.; WOESTENBORGH, F.; MEERPOEL, L.; HEERES, J.; BOSSCHE, H.V.; BORGERS, M. *In Vitro* and *In Vivo* Activities of the Novel Azole Antifungal Agent R126638. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, p. 388-391, 2004.

ODDS, F.C.; BROWN, A.J.P.; GOW, N.A.R. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, v. 11, p. 272-279, 2003.

ONIFADE, A.A.; AL-SANE, N.A.; AL-MUSALLAM, A.A.; AL-ZARBAN, S. A review: Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. **Bioresource Technology**, v. 66, p. 1-11, 1998.

OSBORNE, C.S.; LEITNER, I.; FAVRE, B.; RYDER, N.S. Amino Acid Substitution in *Trichophyton rubrum* Squalene Epoxidase Associated with Resistance to Terbinafine. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, p. 2840-2844, 2005.

PAIÃO, F.G.; SEGATO, F.; CURSINO-SANTOS, J.R.; PERES, N.T.A.; MARTINEZ-ROSSI, N.M. Analysis of *Trichophyton rubrum* gene expression in response to cytotoxic drugs. **FEMS Microbiology Lett**, v. 271, p. 180-186, 2007.

PARI, L.; KUMAR, N.A. Hepatoprotective activity of *Moringa oleifera* on antitubercular drug-induced liver damage in rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 5, p.171–177, 2002.

PELEGRINI, P.B.; FRANCO, O.L. Plant γ -thionins: Novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, p. 2239-2253, 2005.

PEREIRA, M.L. **Aspectos estruturais, farmacológicos e toxicológicos de Mo-CBP₄, uma proteína ligante à quitina de *Moringa oleifera* com atividade anti-inflamatória e antinociceptiva via oral.** Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, 2014.

PEREIRA, M.L.; OLIVEIRA, H.D.; OLIVEIRA, J.T.A.; GIFONI, J.M.; ROCHA, R.O.; SOUSA, D.O.B.; VASCONCELOS, I.M. Purification of a Chitin-Binding Protein from *Moringa oleifera* Seeds with Potential to Relieve Pain and Inflammation. **Protein & Peptide Letters**, v. 18, p. 1078-1085, 2011.

PERES, N.T.A.; ROSSI, A.; MARANHÃO, F.C.A.; MARTINEZ-ROSSI, N.M. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, p. 657-67, 2010.

PIRACCINI, B.M.; ALESSANDRINI, A. Onychomycosis: A Review. **Journal of Fungi**, v. 1, p. 30-43, 2015.

POLLACK, J.H.; LANGE, C.F.; HASHIMOTO, T. "Nonfibrillar" Chitin Associated with Walls and Septa of *Trichophyton mentagrophytes* Arthrospores. **Journal of bacteriology**, v. 154, p. 965-975, 1983.

RAHMAN, A.; AL-REZA, S.M.; SIDDIQUI, S.A.; CHANG, T.; KANG, S.C. Antifungal potential of essential oil and ethanol extracts of *Lonicera japonica* Thunb. against dermatophytes. **Experimental and Clinical Sciences Journal**, v. 13, p. 427-436, 2014.

RAMACHANDRAN, C.; PETER, K.V.; GOPALAKRISHNAN, P.K. Drumstick (*Moringa oleifera*): A Multipurpose Indian Vegetable. **Economic Botany**, v. 34, p. 276-283, 1980.

RAMOS, D.B.M.; GOMES, F.S.; NAPOLEÃO, T.H.; PAIVA, P.M.G.; SILVA, M.D.C.; COELHO, L.C.B.B. Antimicrobial Activity of *Cladonia verticillaris* Lichen Preparations on Bacteria and Fungi of Medical Importance. **Chinese Journal of Biology**, 2014.

RATHER, I.A.; AWASTHI, P.; MAHAJAN, V.; BEDI, Y.S.; VISHWAKARMA, R.A.; GANDHI, S.G. Molecular cloning and functional characterization of an antifungal PR-5 protein from *Ocimum basilicum*. **Gene**, v. 558, p. 143-151, 2015.

REGENTE, M.C.; GIUDICI, A.M.; VILLALÁIN, J.; CANAL, L. The cytotoxic properties of a plant lipid transfer protein involve membrane permeabilization of target cells. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, p. 183-189, 2005.

RIBEIRO, S.F.F.; TAVEIRA, G.B.; CARVALHO, A.O.; DIAS, G.B.; CUNHA, M.; SANTA-CATARINA, C.; RODRIGUES, R.; GOMES, V.M. Antifungal and Other Biological Activities of Two 2S Albumin-Homologous Proteins Against Pathogenic Fungi. **Protein Journal**, v. 31, p. 59-67, 2012.

RIBEIRO, S.M.; ALMEIDA, R.G.; PEREIRA, C.A.A.; MOREIRA, J.S.; PINTO, M.F.S.; OLIVEIRA, A.C.; VASCONCELOS, I.M.; OLIVEIRA, J.T.A.; SANTOS, M.O.; DIAS, S.C.; FRANCO, O.L. Identification of a *Passiflora alata* Curtis dimeric peptide showing identity with 2S albumins. **Peptides**, v. 32, p. 868-874, 2011.

RIVERA, Z.S.; LOSADA, L.; NIERMAN, W.C. Back to the Future for Dermatophyte Genomics. **mBio**, v. 3, 2012.

SACHAN, D.; JAIN, S.K.; SINGH, N. *In-vitro* & *in-vivo* efficacy of *Moringa oleifera* plant constituents in urolithiasis as antilithiatic drug. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 2, p. 1638-1644, 2011.

SEGAL, E.; FRENKEL, M. Dermatophyte infections in environmental contexts. **Research in Microbiology**, v. 20, p. 1-6, 2015.

SEYEDMOUSAVI, S.; MOUTON, J.W.; MELCHERS, W.J.G.; BRÜGGEMANN, R.J.M.; VERWEIJ, P.E. The role of azoles in the management of azole-resistant aspergillosis: From the bench to the bedside. **Drug Resistance Updates**, v. 17, p. 37-50, 2014.

SHARMA, B.; KUMAR, P.; JOSHI, S.C. Topical Treatment of Dermatophytic Lesion on Mice (*Mus musculus*) Model. **Indian Journal Microbiology**, v. 51, p. 217-222, 2011.

SHEEHAN, D.J.; HITCHCOCK, C.A.; SIBLEY, C.M. Current and Emerging Azole Antifungal Agents. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, p. 40-79, 1999.

SHIRAKI, Y.; ISHIBASHI, Y.; HIRUMA, M.; NISHIKAWA, A.; IKEDA, S. Cytokine secretion profiles of human keratinocytes during *Trichophyton tonsurans* and *Arthroderma benhamiae* infections. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 1175-1185, 2006.

SILVA NETO, J.X. **Purificação, caracterização bioquímica e atividade contra *Candida* spp. de uma nova proteína ligante à quitina de sementes de *Moringa oleifera* LAM.** Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, 2015.

SIMPANYA, M.F. Dermatophytes: Their taxonomy, ecology and pathogenicity. **Revista Iberoamericana de Micología**, 2000.

SMIJS, T.G.M.; PAVEL, S. The Susceptibility of Dermatophytes to Photodynamic Treatment with Special Focus on *Trichophyton rubrum*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, p. 2-13, 2011.

TALREJA, T. Screening of crude extract of flavonoids of *Moringa oleifera* against bacterial and fungal pathogen. **Journal of Phytology**, v. 11, p. 31-35, 2010.

TATSADJIEU, N.L.; DONGMO, P.M.J.; NGASSOUM, M.B.; ETOA, F.X.; MBOFUNG, C.M.F. Investigations on the essential oil of *Lippia rugosa* from Cameroon for its potential use as antifungal agent against *Aspergillus flavus* Link ex. Fries. **Food Control**, v. 20, p. 161-166, 2009.

TRINDADE, M.B.; LOPES, J.L.; SOARES-COSTA, A.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.; MOREIRA, R.A.; OLIVA, M.L.; BELTRAMINI, L.M. Structural characterization of novel chitin-binding lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. **Biochim Biophys Acta**, v. 1764, p. 146–152, 2006.

VALENTE, J.; ZUZARTE, M.; GONÇALVES, M.J.; LOPES, M.C.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L.; CRUZ, M.T. Antifungal, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Oenanthe crocata* L. essential oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, p. 349-354, 2013.

VAN DAMME, E.J.M.; PEUMANS, W.J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, p. 575–692, 1998.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A.T. Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. **International Journal of Microbiology**, 2012.

VAN PARIJS, J.; BROEKAERT, W.F.; GOLDSTEIN, I.J.; PEUMANS, W.J. Hevein: An antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, v. 183, p. 258-264, 1991.

VASCONCELOS, I.M.; OLIVEIRA, J.T.A.O. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**, v. 44, p. 385-403, 2004.

VERMOUT, S.; TABART, J.; BALDO, A.; MATHY, A.; LOSSON, B.; MIGNON, B. Pathogenesis of Dermatophytosis. **Mycopathologia**, v. 166, p. 267-275, 2008.

WAGNER, D.K.; SOHNLE, P.G. Cutaneous Defenses against Dermatophytes and Yeasts. **Clinical microbiology reviews**, v. 8, p. 317-335, 1995.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R.C. The Dermatophytes. **Clinical microbiology reviews**, v. 8, p. 240-259, 1995.

WHITE, T.C.; OLIVER, B.G.; GRÄSER, Y.; HENN, M.R. Generating and Testing Molecular Hypotheses in the Dermatophytes. **Eukaryotic cell**, v. 7, p. 1238-1245, 2008.

YAN, J.; YUAN, S.; JIANG, L.; YE, X.; NG, T.B.; WU, Z. Plant antifungal proteins and their applications in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 4961-4981, 2015.

YAO, Q.; WU, C.F.; LUO, P.; XIANG, X.C.; LIU, J.J.; MOU, L.; BAO, J.K. A new chitin-binding lectin from rhizome of *Setcreasea purpurea* with antifungal, antiviral and apoptosis-inducing activities. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1477-1485, 2010.

YOULE, R.; HUANG, A.H.C. Occurrence of low molecular weight and high cysteine containing albumin storage protein in oilseeds of diverse species. **American Journal of Botany**, v.68, p. 44-48, 1981.

ZHANG, A.Y.; CAMP, W.L.; ELEWSKI, B.E. Advances in Topical and Systemic Antifungals. **Dermatologic Clinics**, v. 25, p. 165-183, 2007.

ZOMORODIAN, K.; UTHMAN, U.; TARAZOOIE, B. The effect of griseofulvin on the gene regulation of β -tubulin in the dermatophyte pathogen *Trichophyton rubrum*. **Journal of Infection Chemotherapy**, v. 13, p. 373-379, 2007.

ZURITA, J.M.D.; HAY, R.J. Adherence of Dermatophyte Microconidia and Arthroconidia to Human Keratinocytes in vitro. **The journal of investigative dermatology**, v. 89, p. 529-534, 1987.