

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

ADRIELLE HOFFMANN

**OCORRÊNCIA E SUSCETIBILIDADE *in vitro* A TERBINAFINA,  
CICLOPIROX, CETOCONAZOL E ITRACONAZOL, COM ÊNFASE NA  
COMBINAÇÃO ENTRE AS DROGAS ANTIFÚNGICAS DE AGENTES DE  
ONICOMICOSE NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO**

VITÓRIA  
2011

ADRIELLE HOFFMANN

**OCORRÊNCIA E SUSCETIBILIDADE *in vitro* A TERBINAFINA,  
CICLOPIROX, CETOCONAZOL E ITRACONAZOL, COM ÊNFASE NA  
COMBINAÇÃO ENTRE AS DROGAS ANTIFÚNGICAS DE AGENTES DE  
ONICOMICOSE NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariceli Lamas de Araújo

VITÓRIA

2011

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

H699o Hoffmann, Adrielle, 1987-  
Ocorrência e suscetibilidade *in vitro* a terbinafina, ciclopirox, cetoconazol e itraconazol, com ênfase na combinação entre as drogas antifúngicas de agentes de onicomicose no estado do Espírito Santo / Adrielle Hoffmann. – 2011.  
92 f. : il.

Orientador: Mariceli Lamas de Araújo.  
Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) –  
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Onicomicose . 2. Dermatofitos. 3. Antimicóticos.  
4. Fungos. I. Araujo, Mariceli Lamas de. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

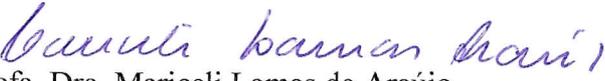
A mestranda ADRIELLE HOFFMANN apresentou dissertação intitulada: “OCORRÊNCIA E SUSCETIBILIDADE *in vitro* A TERBINAFINA, CICLOPIROX, CETOCONAZOL E ITRACONAZOL, COM ÊNFASE NA COMBINAÇÃO ENTRE AS DROGAS ANTIFÚNGICAS DE AGENTES DE ONICOMICOSE NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO” em sessão pública, no dia 10 de agosto de 2011, como requisito final para obtenção do título de **Mestre em Doenças Infecciosas**, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora da Dissertação decidiu (X) **aprovar** ( ) **reprovar** a dissertação para habilitar a bióloga ADRIELLE HOFFMANN a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória-ES, 10 de agosto de 2011

  
Prof. Dr. Daniel de Assis Santos  
(Membro Externo)

  
Prof. Dr. Moises Palaci  
(Membro Interno)

  
Prof. Dra. Mariceli Lamas de Araújo  
(Orientadora)



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Vitória-ES, 09 de março de 2006

Do: Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira  
Coordenador  
Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde

Para: Profa. Mariceli Araújo Ribeiro  
Pesquisadora Responsável pelo Projeto de Pesquisa intitulado:  
"Dermatomicoses em Pacientes Imunocomprometidos"

Senhora Pesquisadora,

Através deste informamos à V.Sa., que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, após analisar o Projeto de Pesquisa intitulado: "**Dermatomicoses em Pacientes Imunocomprometidos**", bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, cumprindo os procedimentos internos desta Instituição, bem como as exigências das Resoluções 196 de 10.10.96, 251 de 07.08.97 e 292 de 08.07.99, APROVOU o referido projeto, em reunião ordinária realizada em 08 de março de 2006.

Gostaríamos de lembrar que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar os relatórios parciais e finais de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196 de 10/10/96, inciso IX.2. letra "c".

Atenciosamente,

  
Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira  
Coordenador  
Comitê de Ética em Pesquisa  
Centro Biomédico / UFES

Aos meus pais, Naide e Benjamim, ao meu irmão Wesley e a todos que me deram o apoio imprescindível para essa realização.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais esta conquista e por cada pessoa que pôs em minha vida para que essa etapa pudesse se realizar. A Ele toda a graça pelos dons que me concedeu e pela força para superar os obstáculos que me fazem crescer a cada dia.

Aos meus pais, meus primeiros e eternos grandes mestres, pelo apoio e confiança, por todos os ensinamentos de humildade, respeito e dignidade, fundamentais para a construção do meu caráter.

Ao meu irmão, amigo e companheiro, Wesley e à minha prima, Suzanne, pelo companheirismo, amizade e por todos os momentos compartilhados;

A toda minha família pelo apoio.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariceli, por quem tenho imensa admiração e gratidão; agradeço pela orientação, pela confiança, pela oportunidade de iniciar minha vida científica desde o primeiro momento na graduação e por todo carinho e compreensão que sempre teve na transmissão de conhecimento.

À Simone, não caberia aqui a gratidão que lhe tenho; como companheira de laboratório, como amiga e como farmacêutica - bioquímica do Laboratório de Micologia, sempre atenciosa e paciente diante de minhas dúvidas.

Ao Técnico do Laboratório de Micologia José Mauro da Vitória, pelos ensinamentos e paciência e pela coleta do material, sem o qual este trabalho não seria realizado.

A todos os meus amigos que compreenderam minha ausência em momentos importantes.

Às amigas Bruna, Manuela, Suzanne, Vanessa, Cris, Thaís, Aline e a todas que tornaram meus momentos mais alegres e descontraídos.

Aos colegas do laboratório de micologia Simone, Ludmila, Bruna, Samila, Aline e Roberta pela excelente convivência.

Às técnicas Lia e Idenir pela lavagem de material, pelo carinho e prestatividade.

A todos os amigos e funcionários do departamento que possibilitaram a conclusão da pesquisa.

Aos pacientes, sem os quais não haveria possibilidade para a realização deste trabalho.

A FAPES (Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia do Espírito Santo) pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos os colegas de turma.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas, pelos preciosos ensinamentos e a todos os colaboradores pelos auxílios necessários.

Enfim, a todos os que participaram de alguma forma dessa etapa, meu muito obrigada!

*“A sabedoria inferior é dada pelo quanto uma pessoa sabe e a superior é dada pelo quanto ela tem consciência de que não sabe.*

*Tenha a sabedoria superior. Seja um eterno aprendiz na escola da vida.”*

Chico Xavier

## RESUMO

As onicomicoses, infecções fúngicas de unhas, são causadas por fungos filamentosos dermatófitos e não-dermatófitos e leveduras e representam as micoses superficiais mais difíceis de serem diagnosticadas e tratadas. O tratamento é através do uso tópico e/ou oral com drogas antifúngicas e pode ainda envolver a remoção da unha. O uso de agentes tópicos concomitante à terapia sistêmica leva à melhores resultados clínicos e micológicos. A eficácia da associação medicamentosa pode estar associada à ação complementar entre as drogas, envolvendo diferentes níveis de penetração ungueal e, dependendo dos antifúngicos, de diferentes alvos de ação na célula fúngica. O objetivo do presente estudo consistiu em estabelecer a ocorrência de fungos filamentosos na etiologia das onicomicoses e a suscetibilidade *in vitro* destes às drogas terbinafina, ciclopirox olamina, cetoconazol e itraconazol, conforme o documento M38-A2 (2008) do CLSI. Foi também avaliada a combinação entre estas drogas antifúngicas através do cálculo do índice fracionário de concentração inibitória (IFCI). Nossos resultados demonstraram que prevalência das onicomicoses, no período de janeiro de 2009 a abril de 2011, em Vitória, ES, foi de 50% dentre as dermatomicoses. A maioria dos isolados (77%) foi obtido de pacientes do sexo feminino e o local de maior acometimento foram as unhas dos pés para ambos os sexos. As unhas das mãos foram mais acometidas por leveduras e as unhas dos pés, por fungos filamentosos. Em geral, os gêneros de fungos filamentosos mais predominantes na etiologia das onicomicoses foram *Trichophyton spp* (21,7%), *Fusarium spp.* (11,2%) e *Scytalidium spp.*(8,4%). Para fungos filamentosos, os testes de suscetibilidade *in vitro* mostraram que isolados de dermatófitos foram mais sensíveis que isolados do grupo não-dermatófitos. Entre os não-dermatófitos, *Fusarium spp.* foi menos inibido que *Scytalidium spp.*, que por sua vez, foi menos inibido que o dermatófito *Trichophyton spp.* Dentre as combinações testadas não houve nenhum efeito antagônico e, com exceção daquela entre itraconazol e cetoconazol, as demais apresentaram efeito sinérgico sobre algum isolado. A combinação entre drogas apresentou maiores índices de sinergismo para o gênero *Scytalidium spp.* O melhor resultado para este gênero foi também obtido pela combinação itraconazol e terbinafina.

**Palavras-chave:** onicomicoses, dermatófitos, não-dermatófitos, teste de suscetibilidade, combinação de drogas.

## ABSTRACT

The onychomycosis, fungal nail infections, are caused by filamentous fungi dermatophytes and non-dermatophytes and yeasts and represent the most difficult superficial mycosis to be diagnosed and treated. Treatment involves use of topical and/or oral antifungal drugs, as well as removal of the nail. The use of topical agents concomitant to systemic therapy leads to better clinical and mycological results. The efficacy of combination therapy may be associated with a complementary action between the drugs, involving different levels of nail penetration and, depending on the antifungal, different targets of action in the fungal cell. The purpose of this study was to establish the occurrence of filamentous fungi in the etiology of onychomycosis and *in vitro* susceptibility to the drugs terbinafine, ciclopirox olamine, ketoconazole and itraconazole, according to document M38-A2 (2008) CLSI. It was also evaluated the combination among these antifungal drugs by calculating the fractional inhibitory concentration index (FICI). Our results showed that the prevalence of onychomycosis in the period from January 2009 to April 2011, in Vitoria, ES, Brazil, was 50% among the dermatomycosis cases. Most of the isolates (77%) were obtained from female patients and toenails were the local with greater involvement for both sexes. The fingernails were more affected by yeast and toenails, by filamentous fungi. In general, the genera of filamentous fungi more prevalent in the etiology of onychomycosis was *Trichophyton* spp (21.7%), *Fusarium* spp. (11.2%) and *Scytalidium* spp. (8.4%). For filamentous fungi, the *in vitro* susceptibility testing showed that dermatophytes were more susceptible than non-dermatophytes isolates. Among non-dermatophytes, *Fusarium* spp. was less inhibited than *Scytalidium* spp., which in turn, was less inhibited than the dermatophyte *Trichophyton* spp. Among the combinations tested, there was no antagonistic effect and, with exception of ketoconazole and itraconazole, those ones showed synergistic effect for isolates. The best results were presented for combinations involving itraconazole and terbinafine. The drug combination with greater synergistic effect was observed for genus *Scytalidium* spp. being that the combination itraconazole and terbinafine presented also the best results for this genus.

**Key words:** onychomycosis, dermatophytes, non-dermatophytes, susceptibility tests, drug combination.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Distribuição das amostras clínicas positivas para fungos segundo a espécie isolada, o local anatômico e o sexo do paciente .....	45
<b>Tabela 2:</b> Resultados do exame microscópico direto e cultura de amostras de unhas .....	46
<b>Tabela 3:</b> Distribuição das amostras de unhas quanto ao sexo dos pacientes e ao local da lesão .....	47
<b>Tabela 4:</b> Prevalência de fungos filamentosos nas onicomicoses (de acordo com o local da lesão e com as espécies) .....	47
<b>Tabela 5:</b> Distribuição dos grupos e espécies fúngicas de acordo com local da lesão no sexo feminino .....	49
<b>Tabela 6:</b> Distribuição dos grupos e espécies fúngicas de acordo local da lesão no sexo masculino .....	49
<b>Tabela 7:</b> Faixas de variação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de quatro antifúngicos frente a três gêneros de fungos filamentosos .....	50
<b>Tabela 8:</b> Valores das CIMs 50 e 90 de quatro antifúngicos frente a três gêneros de fungos filamentosos .....	51
<b>Tabela 9:</b> Número de sinergismos resultantes da interação de 4 antifúngicos na inibição de isolados dos gêneros <i>Trichophyton</i> , <i>Scytalidium</i> e <i>Fusarium</i> .....	52
<b>Tabela 10:</b> Interações de Itraconazol (ITR), Terbinafina (TRB), Cetoconazol (CTZ) e Ciclopirox (CPX) contra isolados de <i>Scytalidium dimidiatum</i> .....	53
<b>Tabela 11:</b> Interações de Itraconazol (ITR), Terbinafina (TRB), Cetoconazol (CTZ) e Ciclopirox (CPX) contra isolados de <i>Fusarium</i> .....	54
<b>Tabela 12:</b> Interações de Itraconazol (ITR), Terbinafina (TRB), Cetoconazol (CTZ) e Ciclopirox (CPX) contra isolados de <i>T. rubrum</i> .....	55
<b>Tabela 13:</b> Variações de CIMs ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) de antifúngicos testados frente a três gêneros de fungos filamentosos .....	62

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> anatomia da unha .....	23
<b>Figura 2:</b> Esquema da distribuição de drogas na placa de microdiluição, utilizando como exemplo a combinação entre terbinafina (TRB) e ciclopiroxolamina (CPX) .....	46
<b>Figura 3:</b> Freqüência das dermatomicoses segundo o sítio anatômico acometido .....	48
<b>Figura 4:</b> Distribuição dos grupos fúngicos agentes de onicomicoses de acordo com o local de isolamento .....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ATCC** – “American Type Culture Collection”

**CBM** – Centro Biomédico de Maruípe

**CIM** – Concentração inibitória mínima

**CLSI** – “Clinical and Laboratory Standart Institute”

**CPX** - Ciclopirox olamina

**CTZ** – Cetoconazol

**DMSO** – Dimetil sulfóxido

*et al.* - e outros

**EUA** – Estados Unidos da América

**HIV** – “Human immunodeficiency vírus”

**HUCAM** - Hospital Universitário Antônio Cassiano de Moraes

**IFCI** – Índice Fracionário ee Concentração Inibitória

**ITR** – Itraconazol

**KOH** – Hidróxido de Potássio

**MOPS** - 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid

**pH** – Potencial hidrogeniônico

**RPMI**- “Roswell Park Memorial Institute medium”

**SIDA** – Síndrome da imunodeficiência adquirida

**TRB** – Terbinafina

**UFES** – Universidade Federal do Espírito Santo

## LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem

> - maior que

≤ - menor ou igual a

°C – Graus Celsius

Fe<sup>3+</sup> - Cátion ferro trivalente

mg mL<sup>-1</sup> – miligrama por mililitro

μg mL<sup>-1</sup> – micrograma por mililitro

μL - microlitro

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	20
2 OBJETIVOS .....	22
2.1 Objetivo Geral .....	22
2.2 Objetivos Específicos .....	22
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	23
3.1 Anatomia e Composição da unha .....	23
3.2 Classificação clínica das onicomicoses .....	24
3.3 Características dos fungos filamentosos, agentes de onicomicoses .....	26
3.3.1 Dermatófitos .....	26
3.3.1.1 O gênero <i>Trichophyton</i> .....	27
3.3.2 Fungos filamentosos não dermatófitos (FFND) .....	27
3.3.2.1 O gênero <i>Fusarium</i> .....	27
3.3.2.2 O gênero <i>Scytalidium</i> .....	28
3.4 Etiologia das onicomicoses .....	29
3.4.1 Onicomicoses por Dermatófitos .....	29
3.4.2 Onicomicose por Fungos Filamentosos Não-Dermatófitos .....	30
3.5 Epidemiologia das Onicomicoses .....	31
3.5.1 Onicomicoses no Brasil .....	32
3.5.2 Onicomicose no mundo .....	33
3.6 Tratamento das onicomicose .....	34
3.6.1 Antifúngicos .....	35
3.6.1.1 Terbinafina .....	36
3.6.1.2 Ciclopirox olamina .....	36
3.6.1.3 Azólicos .....	37

3.6.2 Tratamento sistêmico .....	38
3.6.3 Tratamento Tópico .....	39
3.6.4 Uso combinado de antifúngicos .....	41
4 METODOLOGIA .....	42
4.1 Pacientes .....	42
4.2 Coleta do material clínico .....	42
4.3 Exame micológico .....	42
4.4 Teste de Suscetibilidade a drogas antifúngicas (TSA) .....	43
4.4.1 Isolados .....	43
4.4.2. Meio de cultura empregado no teste .....	43
4.4.3 Drogas antifúngicas .....	43
4.4.4 Preparo do inóculo .....	44
4.4.5 Realização do teste .....	44
4.4.6 Tempo e temperatura de incubação .....	45
4.4.7 Leitura da Concentração mínima inibitória (CIM) .....	45
4.4.8 Teste de suscetibilidade antifúngica com combinação de drogas .....	45
4.4.9 Leitura e interpretação dos resultados da combinação de drogas .....	46
5. RESULTADOS .....	47
5.1 Etiologia das onicomicoses .....	48
5.2 Testes de suscetibilidade .....	52
5.3 Combinação de drogas .....	53
6 DISCUSSÃO .....	58
7 CONCLUSÃO .....	67
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	68
9. ANEXOS .....	79

## 1 INTRODUÇÃO

Onicomicoses são infecções fúngicas relativamente comuns, que acometem a placa e o leito ungueal levando ao espessamento, endurecimento, descoloração e desintegração da unha (Nair *et al.*, 2009). Chegam a atingir de 2 a 13% da população, representando cerca de 30% de todas as infecções ungueais (Gupta *et al.*, 2000; Albert *et al.*, 2004).

As onicomicoses podem ser causadas por diversas espécies de fungos dos grupos dermatófitos, fungos filamentosos não dermatófitos (FFND) e leveduras. A distribuição destes diferentes patógenos não é uniforme, e depende de vários fatores tais como clima, área geográfica e migração (Martins *et al.*, 2007).

Em países em desenvolvimento, a atenção médica é voltada mais para problemas socioeconômicos e doenças mais graves, ficando as onicomicoses muitas vezes ignoradas por médicos e pela população em geral. Embora haja uma aparência nitidamente doente associada a esta condição, a onicomicose é muitas vezes considerada apenas um problema cosmético, de importância relativamente menor, que não vale o esforço de procurar tratamento em muitos casos. Apesar das onicomicoses raramente serem fatais, a sua alta incidência e prevalência e a morbidade associada, a tornam um importante problema de saúde pública (Baran *et al.*, 2005; Kaur *et al.*, 2008). A incidência está relacionada a vários fatores incluindo idade, sexo, atividade social, clima e doenças de base (Martins *et al.*, 2007; Iannidou *et al.*, 2006; Finch *et al.* 2007).

As distrofias ungueais, hoje são reconhecidas como problemas de saúde que, quando não tratados, podem levar à complicações. Em pessoas diabéticas, por exemplo, as onicomicoses podem evoluir para uma lesão na pele e levar a infecções secundárias, que tendem à amputação das extremidades. (Gupta *et al.*, 2003) Aproximadamente 26% dos pacientes diabéticos têm onicomicose e, quando comparados com não diabéticos, há um aumento do risco de complicações secundárias (Elewski *et al.*, 2005). Constituem, também, uma doença comum e crônica com efeitos negativos substanciais na qualidade de vida. Causam desconforto, que pode limitar a atividade física, podendo ainda propiciar uma porta

de entrada para infecções secundárias (Finch *et al.*, 2007; Godoy-Martinez *et al.*, 2009).

As onicomicoses representam as micoses superficiais mais difíceis de serem diagnosticadas e tratadas e, mesmo que o diagnóstico e tratamento sejam realizados corretamente, pelo menos um em cada cinco pacientes não se cura definitivamente (Ballesté *et al.*, 2003; López-Jodra *et al.*, 1999).

O tratamento envolve o tratamento tópico e/ou oral com antifúngicos, podendo chegar à necessidade de remoção da unha. O tratamento tópico pode ser na forma de cremes, loções, pós ou soluções. Os novos tratamentos tópicos referem-se à introdução de esmaltes à base de amorolfina e ciclopirox olamina (Gupta *et al.*, 2003).

O tratamento sistêmico da onicomicose consiste da administração oral dos antifúngicos por vários meses até a cura, resistência ou efeitos adversos aparecerem. As principais drogas sistêmicas aprovadas e amplamente utilizadas pertencem aos grupos das allilaminas e dos azólicos. O uso de agentes tópicos concomitante à terapia sistêmica leva à melhores resultados clínicos e micológicos. A eficácia da associação medicamentosa pode estar associada à ação complementar entre estas, envolvendo diferentes níveis de penetração ungueal e, dependendo dos antifúngicos, de diferentes alvos de ação na célula fúngica (Welsh *et al.*, 2010).

Vários fatores devem ser considerados para o tratamento da infecção fúngica, como o número de unhas atingidas, o nível da infecção e o agente etiológico; sendo este último o fator de maior relevância devido aos diferentes perfis de suscetibilidades dos agentes aos antifúngicos. Sem tratamento, as unhas podem torna-se espessas, causando pressão irritação e dor nas bordas ungueais (Finch *et al.*, 2007).

Diante das informações supracitadas, percebe-se a importância de verificar as interações entre os antifúngicos, na tentativa de demonstrar *in vitro* as melhores opções para a dinamização do tratamento das onicomicoses.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivo Geral

Estabelecer a ocorrência de fungo filamentoso na etiologia das onicomicoses e sua suscetibilidade *in vitro* a terbinafina, ciclopirox olamina, cetoconazol e itraconazol, com ênfase na combinação entre as drogas antifúngicas, no estado do Espírito Santo

### 2.2 Objetivos Específicos

- 1) Estabelecer a frequência de onicomicoses nos pacientes atendidos nos ambulatórios de Dermatologia do Hospital Universitário Antônio Cassiano de Moraes (HUCAM);
- 2) Definir a etiologia das onicomicoses
- 3) Estabelecer a prevalências dos grupos de fungos, agentes de onicomicoses (leveduras, filamentos dermatófitos e não-dermatófitos)
- 4) Relacionar os casos de onicomicose com o sexo do paciente e local da onicomicose (mãos ou pés);
- 5) Comparar o padrão de suscetibilidade *in vitro* de fungos filamentosos dermatófitos e não-dermatófitos diante de antifúngicos utilizados no tratamento tópico e oral das onicomicoses;
- 6) Realizar testes de suscetibilidade utilizando combinações das drogas antifúngicas terbinafina, ciclopirox olamina, cetoconazol e itraconazol;
- 7) Comparar os efeitos das combinações de drogas sobre os fungos mais freqüentemente envolvidos na etiologia das onicomicoses.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Anatomia e Composição da unha

Entender a estrutura, a composição e as propriedades ungueais é fundamental para a compreensão da patogênese das micoses, para o desenvolvimento de drogas potentes e também para compreender o potencial tóxico dessas drogas sobre as unhas (Vejnovic *et al.*, 2010).

A unha pode ser compreendida como um conjunto de estruturas, onde cada uma exerce seu papel. A lâmina ou placa ungueal é composta por células epiteliais queratinizadas; a matriz ungueal compreende o quarto proximal do leito ungueal e são as suas células que produzem a queratina rígida do leito, formado por várias camadas de células epiteliais, e localizado entre a matriz e o hiponíquio, sendo o último a porção entre a parte livre da placa e o sulco distal; o hiponíquio também atua como barreira protetora contra microorganismos. A parte proximal da unha é coberta por uma extensão de pele, a dobra ungueal, que por sua vez, é protegida pelo eponíquio ou cutícula, prevenindo a entrada de fungos e bactérias. A porção ventral da placa consiste queratina flexível, que é produzida pelas células do leito, ao qual está firmemente ligada (Mahoney *et al.*, 2003; Richardson *et al.*, 2000).

Yarak *et al.* (2009) publicaram a seguinte ilustração, que facilita bastante a compreensão do tema:

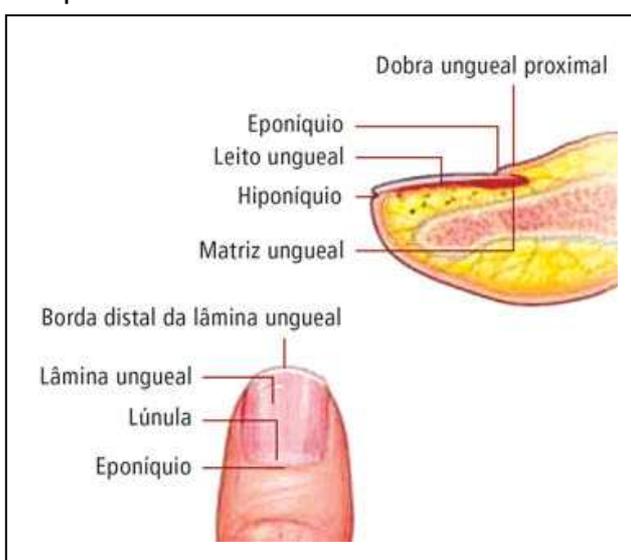


Figura 1: anatomia da unha

A composição química da unha difere significativamente de outros tecidos do corpo: é composta de moléculas de queratina com muitas ligações dissulfeto e baixo nível de lipídeos associados, não se assemelha a nenhuma outra barreira do corpo e comporta-se mais como um gel hidratado do que como uma membrana lipofílica (Elkeeb *et al.*, 2010). Com a idade, a composição ungueal muda, havendo aumento de carbono presente. Há também diferenças em relação ao sexo: unhas de mulheres possuem mais enxofre e menos nitrogênio em relação às unhas dos homens (Vejnovic *et al.*, 2010).

### 3.2 Classificação clínica das onicomicoses

De acordo com as formas clínicas, as onicomicoses foram classificadas por Roberts *et al.* (1990) em onicomicose subungueal distal e lateral (OSDL), onicomicose branca superficial (OBS), onicomicose subungueal proximal (OSP) ou onicodistrofia total (OT).

- a) Onicomicose subungueal distal e lateral é a variedade clínica mais freqüente (90%); a invasão começa no hiponíqueo e na borda distal e lateral da lâmina ungueal, estendendo-se de forma lenta e progressiva até o setor proximal da unha (Zanardi *et al.*, 2008; Elewski, 1998; Araujo *et al.*, 2003);
- b) Onicomicose branca superficial representa 2 a 5% das onicomicoses dermatofíticas, caracteriza-se pela penetração *in situ* de estruturas fúngicas em direção ao interior da lâmina ungueal, podendo ser facilitada por traumas anteriores. É mais comumente observada nas unhas dos pés (Zanardi *et al.*, 2008; Elewski, 1998; Araujo *et al.*, 2003);
- c) Onicomicose subungueal proximal é a variante clínica menos comum, sendo observada com maior freqüência em indivíduos com síndrome da imunodeficiência adquirida (Zanardi *et al.*, 2008; Elewski, 1998; Araujo *et al.*, 2003);
- d) Onicodistrofia total (OT): é o estágio final das onicomicoses por dermatófitos, não dermatófitos ou *Candida* sp. Verifica-se acometimento da matriz ungueal,

e a totalidade da unha está alterada (Zanardi *et al.*, 2008; Elewski, 1998; Araujo *et al.*, 2003);

Hay & Baran (2011), propõem uma nova classificação no intuito de facilitar o reconhecimento para diagnóstico clínico visando melhor correspondência entre este e o diagnóstico micológico laboratorial.

- a) OSDL permanece a forma mais comum de invasão da unha, ocorrendo no hiponíquio lateral ou distal; os agentes mais comumente associados são dermatófitos (*T. rubrum*, *T. interdigitale*), *Candida albicans*, *Fusarium* spp., *Scytalidium* spp. e *Scopulariopsis brevicaulis*;
- b) Onicomicose Superficial pode estar presente com uma variações de distrofias que dependem do agente causador. A invasão é superficial com aspecto mais profundo. O termo “onicomicose branca superficial” restringe a lesão, não incluindo as de aspecto escuro descritas nas infecções por *T. rubrum* e *Scytalidium dimidiatum*.; além destes, *T. interdigitale*, *Acremonium* e *Fusarium* spp. também são comumente isolados;
- c) Onicomicose endonyx: a invasão da placa ungueal é distinguida pela combinação de divisão lamelar, descoloração e ausência de invasão do leito ungueal, havendo uma invasão mais interna. Distingue-se histopatologicamente pela ausência de inflamação e fungos no leito ungueal ou hiperqueratose subungueal, muitas hifas fúngicas encontram-se no interior da placa ungueal; *T. soudanense* e *T. violaceum* são os fungos responsáveis por esse tipo de infecção;
- d) A onicomicose subungueal proximal é, classicamente, vista sob a porção proximal e capilares. Apresenta manchas difusas ou estrias transversais. Estende-se de forma lenta e distal. Infecção de difícil tratamento, sempre requer terapia oral. Pode ser causada, principalmente, por *T. rubrum*, *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. e *C. albicans*;
- e) Onicomicose de padrão misto: quando há manifestação de diferentes formas em um mesmo paciente e na mesma unha;

- f) O conceito de onicomicose distrófica total não mudou, representando o estágio final dos diversos modos de invasão; geralmente, são isolados desse tipo de lesão fungos dermatófitos, *C. albicans* e *Scytalidium* spp.;
- g) Onicomicose secundária: Quando a invasão fúngica ocorre secundária a outra patologia da unha, aqui alterações clínicas são dominadas por características morfológicas da doença de base.

### **3.3 Características dos fungos filamentosos, agentes de onicomicoses**

#### **3.3.1 Dermatófitos**

Os dermatófitos são um grupo de fungos filamentosos constituídos por hifas hialinas septadas e abrange três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. Caracterizam-se pela capacidade de invadir tecidos queratinizados (pele, pelo, unhas), tanto no homem como nos animais, causando infecções superficiais que, no geral, respondem a antifúngicos (Serrano-Martino *et al.*, 2003; Elewski, 1998; Weitzman *et al.*, 1995).

Fungos do grupo dermatófitos são divididos em espécies antropofílicas, zoofílicas e geofílicas em função do seu habitat primário. Dermatófitos antropofílicos são diretamente associados com seres humanos e raramente infectam outros animais. Dermatófitos zoofílicos normalmente infectam animais ou estão associados a animais, mas ocasionalmente infectam humanos. Dermatófitos geofílicos estão associados aos materiais queratinosos, como pêlos, penas, cascos ou chifres, que podem estar presentes na superfície de solos. Podem causar infecções em humanos e animais (Weitzman *et al.*, 1995; Brash *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2006).

As espécies zoofílicas são responsáveis por cerca de 30% das dermatofitoses humanas e geralmente provocam uma inflamação aguda, enquanto que as espécies antropofílicas representam cerca de 70% das infecções nesses hospedeiros, causando uma infecção crônica e de progressão lenta, sugerindo que o fungo esteja melhor adaptado ao hospedeiro humano (Peres *et al.*, 2010).

### 3.3.1.1 O gênero *Trichophyton*

Dentro deste grupo, a espécie antropofílica *Trichophyton rubrum* é a mais freqüente e apresenta ampla distribuição mundial. Nos EUA, em um estudo multicêntrico entre 1999 e 2002, *T. rubrum* foi a espécie fúngica mais prevalente além de mostrar tendência para o aumento nos últimos anos. Parasita com mais freqüência os pés e as unhas, causando a destruição da lâmina ungueal (Hernández-Salazar *et al.*, 2007; Lacaz *et al.*, 2002).

Microscopicamente e em cultura, *T. rubrum* apresenta hifas septadas com microconídios piriformes a arredondados em abundancia, os macroconídios são raros, de parede delgada e multisseptados. O diagnóstico diferencial deve se realizar com *T. interdigitale*, através da prova de urease, cujo resultado para *T. rubrum* é negativo (Hernández-Salazar *et al.*, 2007).

### 3.3.2 Fungos filamentosos não dermatófitos (FFND)

FFND são fungos encontrados comumente na natureza como sapróbios do solo ou patógenos de plantas. A invasão das unhas por estes fungos é variável com prevalências de 1.45 a 17.6%, dependendo principalmente da região e dos diferentes critérios utilizados no diagnóstico de FFND (Tosti *et al.*, 2000; Cavallera *et al.*, 2006; Godoy-Martinez *et al.*, 2004). Em geral, são menos freqüentes que dermatófitos, sendo muitas vezes considerados patógenos secundários. Poucas espécies apresentam capacidade queratinolítica a ponto de causar danos às unhas (Mügge *et al.*, 2006). FFND dos gêneros *Scytalidium* e *Fusarium* são capazes de degradar a queratina das unhas, ainda que essa degradação se dê de forma mais lenta que por dermatófitos (López-Jodra *et al.*, 1999).

#### 3.3.2.1 O gênero *Fusarium*

Entre os FFND, as espécies de *Fusarium* spp. são fitopatógenos de ampla distribuição e, entre as mais de 50 espécies identificadas, 12 já foram descritas como agentes de infecções humanas. Causam infecções humanas superficiais,

invasivas localizadas ou disseminadas. A apresentação clínica da fusariose depende do estado imune e da porta de entrada. Infecções superficiais, como ceratites e onicomicoses, normalmente acometem indivíduos imunocompetentes (Tortorano *et al.*, 2008; Aghamirian *et al.*, 2010; Godoy-Martinez *et al.*, 2004).

Morfologicamente, *Fusarium* spp. se apresentam como fungos filamentosos hialinos e a principal característica do gênero é a produção de conídios multisseptados em forma de fuso. Estes conídios são produzidos em sucessão basípeta e acumulam-se em massas gelatinosas. A taxonomia é dificultada devido ao grande número de espécies que existem na natureza e à complicada formação de conídios que diferencia as espécies (López-Jodra *et al.*, 1999; Araujo *et al.*, 2003b; Godoy-Martinez *et al.*, 2004). As espécies desse gênero mais freqüentemente isoladas em onicomicoses são *F. solani* e *F. oxysporum* (Hattori *et al.*, 2005).

### 3.3.2.2 O gênero *Scytalidium*

Em 1933, no Egito, foi descrito por Natrass, a espécie *Scytalidium dimidiatum*, como um fitopatógeno; encontrado no solo e em detritos de plantas, mas apenas em 1970 foi reconhecido o primeiro caso de infecção cutânea e ungueal em humanos causada por este fungo. Em 1977, Campbell e Mulders isolaram *S. hyalinum* de lesões de pele, o qual não foi encontrado em amostras ambientais (Lacroix *et al.*, 2003; Alvarez *et al.*, 2000; Ungpakorn, 2005).

*Scytalidium* spp. tem sido isolado em vários países tropicais como a Nigéria, Tobago, Gabo, Tailândia, Jamaica e Austrália, consideradas regiões endêmicas, onde a prevalência varia de 9 a 24%. Muitos casos relatados em países temperados são relacionados a imigrantes advindos de áreas tropicais (Lacroix *et al.*, 2008).

*S. dimidiatum* apresenta hifas aéreas de coloração escura variando de cinza a preta, já *S. hyalinum* apresenta coloração clara, sendo ambas as espécies de crescimento mais rápido que os dermatófitos. O isolamento de *Scytalidium hyalinum* é sempre considerado significativo, enquanto que o crescimento de outros FFND precisa ser interpretado com cuidado, pois são comumente encontrados no ambiente (Midgley *et al.*, 1998).

A patogenicidade de *Scytalidium* spp. é baseada na produção de enzimas extracelulares como amilases, proteases e lípases, enfatizando-se sua atividade proteolítica, importante na patogênese da onicomicose por ser responsável pela hidrólise da queratina presente nas unhas e no estrato córneo da pele. Esses fungos não crescem em meio com cicloheximida e mostram alta resistência a antifúngicos tradicionais (De Magalhães Lima *et al.*, 2008; Xavier *et al.*, 2010).

### **3.4 Etiologia das onicomicoses**

Os fungos agentes de onicomicose estão inseridos em três grandes grupos: dermatófitos, leveduras e fungos filamentosos não dermatófitos (FFND). O primeiro grupo é o mais freqüente podendo chegar a 90% na etiologia das infecções nas unhas dos pés (Baran *et al.*, 2005), seguido do grupo de leveduras, que são mais isoladas das unhas das mãos (Cavallera *et al.*, 2006).

#### **3.4.1 Onicomicoses causadas por Dermatófitos**

*Tinea unguium* é o termo utilizado para as infecções ungueais causadas por dermatófitos. A lâmina ungueal madura contém células mortas e não apresenta circulação. Quando dermatófitos invadem esse nicho, dificilmente entram em contato com as células de defesa ou agentes antimicrobianos do sangue. Assim, ocorre a infecção permanente da unha, sem tendência a auto-cura. Os fungos podem ser eliminados mais rapidamente na invasão distal, pelo crescimento da unha, do que na invasão proximal, eliminação que raramente ocorre; especialmente em idosos, cujo crescimento da unha é muito lento (Richardson *et al.*, 2000; Brash, 2010). A infecção é, geralmente, restrita a camadas cornificadas, pois os fungos não têm a capacidade de penetrar em tecidos profundos (Weitzman *et al.*, 1995).

Onicomicoses por dermatófitos podem também serem causadas por contato através de cortadores de unhas ou outros utensílios com áreas do próprio corpo previamente infectadas (Aghamirian *et al.*, 2010).

A grande maioria das infecções fúngicas das unhas é causada pelas espécies *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton interdigitale* e se apresentam em forma de onicomicose distal e lateral e mais raramente na forma branca superficial (Torres-Rodríguez *et al.*, 2006).

### 3.4.2 Onicomicose causadas por Fungos Filamentosos Não Dermatófitos

Os FFND que podem ser isolados de unhas constituem uma longa lista, mas apenas alguns deles são potencialmente causadores de onicomicoses: *Scopulariopsis brevicaulis*, *Fusarium* spp., *Acremonium* spp., *Aspergillus* spp., *Scytalidium* spp. e *Onychocola canadensis* (Araujo *et al.*, 2003b; Gianni *et al.*, 2000). Esses fungos são capazes de colonizar e infectar as unhas, mas são também comumente considerados contaminantes ambientais. Assim, o diagnóstico destes fungos deve ser feito com muita cautela (Castro López *et al.*, 2008). Onicomicose causada por FFND são mais frequentes nas unhas dos pés, pois apresentam maior contato com o solo (Loannidou *et al.*, 2006).

Diversos estudos têm chamado a atenção para o aumento do número de casos de onicomicose não-dermatofítica causadas pelos gêneros *Scytalidium* e *Fusarium*. As hipóteses que buscam explicar esse aumento relatam um melhor reconhecimento desses microrganismos como agentes de infecções primárias; aumento da população imunocomprometida e o uso irracional de medicamentos que aumentam a resistência desses patógenos (Aghamirian *et al.*, 2010).

Onicomicoses por *Fusarium* spp. quase sempre envolve a unha do hálux. O contato mais próximo com o solo, o hábito de andar descalço, usar sandálias ou frequentar piscinas são considerados fatores predisponentes à onicomicose por *Fusarium* spp (Godoy-Martinez *et al.*, 2004).

A unha afetada por *Fusarium* spp. apresenta cor branca-amarelada e, freqüentemente, superfície opaca. A coloração é observada na dobra proximal da unha e a cutícula, indicando a origem proximal da infecção. A parte distal pode apresentar coloração amarelada quando há progressão da micose. A evolução da onicomicose por *Fusarium* é de 1 mês a 15 anos (média de 3 anos) (Araujo *et al.*,

2003b). Já ambas as espécies de *Scytalidium* produzem infecção muito semelhante à *Tinea unguium* (Ballesté *et al.*, 2003).

As espécies de *Fusarium*, geralmente, são resistentes a todas as drogas avaliadas, o que torna a identificação em nível espécies necessária apenas para estudos epidemiológicos (Azor *et al.*, 2009).

### 3.5 Epidemiologia das Onicomicoses

A prevalência de onicomicoses parece diferir em diferentes estudos ao redor do mundo, sendo suas taxas especialmente determinadas por idade, classe social, ocupação, clima, ambiente onde vive e frequência de viagem (Hashemi *et al.*, 2009).

Um dos fatores favoráveis para o aumento da incidência de onicomicoses é a idade avançada; o que pode ser atribuído à baixa circulação periférica, redução da taxa de crescimento ungueal, trauma persistente da unha e exposição prolongada ao patógeno (Martins *et al.*, 2007; Ioannidou *et al.*, 2006; Finch *et al.*, 2007). Essas infecções são também associadas com algumas atividades do cotidiano como a profissão, o uso de sapatos e o cuidado das unhas em salões, que podem resultar no aparecimento de fatores como lacerações, traumatismos e umidade excessiva (Kaur *et al.*, 2008; Alvarez *et al.*, 2004).

Onicomicose associada à síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) é caracterizada por ser clinicamente mais agressiva, com alta frequência de apresentações incomuns e resistência ao tratamento convencional. A prevalência de onicomicoses em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) varia de 15 a 40% e pode ser diretamente relacionada ao grau de imunossupressão (Surjusshe *et al.*, 2007).

Nas zonas de clima temperado, pelo menos 80% das onicomicoses são causadas por dermatófitos *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton interdigitale*. Na América do Norte, infecções por FFND, incluindo *Scopulariopsis brevicaulis*, *Aspergillus flavus* e *Fusarium* spp., são responsáveis por 1,5 a 6% das onicomicoses (Albert *et al.*, 2004).

É difícil saber até que ponto estas variações entre países refletem diferenças reais pois, embora a etiologia das onicomicoses possa estar relacionada a condições climáticas ou geográficas, elas também podem sofrer influência de diferentes métodos de amostragens dos pacientes, como idade, sexo ou tipo clínico da infecção e interpretação de dados laboratoriais. A distinção entre os patógenos (primário ou secundário) e sapróbios colonizadores ou contaminantes não ocorre de forma clara, os critérios utilizados podem variar, o que também influencia bastante nas diferenças (Vélez *et al.*, 1997).

### 3.5.1 Onicomicoses no Brasil

No Brasil, poucos estudos epidemiológicos para onicomicoses são realizados, estando entre os países que destinam a atenção para infecções invasivas, com risco a curto prazo.

Na cidade do Rio de Janeiro, a estimativa de prevalência de onicomicose fica em torno de 19%, com proporção de aproximadamente 5:1 entre onicomicoses nos pés e nas mãos. Os dermatófitos mais comumente associados com a onicomicose foram *T. rubrum* e *T.interdigitale* (Araujo *et al.*, 2003a).

Em São Paulo, 588 pacientes foram estudados, havendo confirmação em 247 casos de onicomicoses, com predomínio de leveduras (52%), seguido de dermatófitos (40,6%) e FFND (7,4%), sendo os últimos isolados apenas nas unhas dos pés (Godoy-Martinez, 2009).

Outro estudo também realizado em São Paulo investigou as unhas de universitários. Apenas dermatófitos foram isolados e *T. rubrum* correspondeu a 80% dos isolados (Siqueira *et al.*, 2006).

Também na cidade do Rio de Janeiro, um trabalho realizado no Serviço de Micologia da Universidade Federal Fluminense, com 9 anos de duração reuniu 6.173 raspados ungueais positivos para diversos fungos; detectando-se um total de 54 casos de onicomicoses por *Scytalidium* spp., sendo 47 (87,03%) localizados nas unhas dos pés, todos na forma subungueal distal e lateral (Xavier *et al.*, 2010).

### 3.5.2 Onicomicose no mundo

Em um estudo prospectivo multicêntrico, em Ontário, no Canadá, foram avaliados 15000 pacientes, aproximadamente 17% apresentaram anormalidades nas unhas e 8% do total apresentaram onicomicoses. Os agentes causadores das onicomicoses nas mãos foram os dermatófitos (70,8%) e *Candida* spp. (29,2%); já nas unhas dos pés foram dermatófitos (90,5%), seguidos de não-dermatófitos (7,8%) e *Candida* spp. (1,7%) (Gupta *et al.*, 2000).

Já na Alemanha, em um estudo retrospectivo, os patógenos mais isolados nas unhas das mãos foram leveduras (46%), seguido de dermatófitos (42%) e FFND (2%) (Mügge *et al.*, 2006).

Em estudo retrospectivo de 15 anos, na Itália, 4046 casos de onicomicose foram analisados. As unhas dos pés foram as mais acometidas. Dermatófitos ocorreram em 71% dos casos, *Candida* 16% e FFND, 13%. Cerca de 60% de pacientes eram do sexo masculino. *Aspergillus* spp., *Scopulariopsis brevicaulis* e *Fusarium* spp. foram os FFND mais isolados; não houve registro de *Scytalidium* spp. (Romano *et al.*, 2005).

Entre os FFND causadores de onicomicoses na Itália, Tosti *et al.* (2000) verificaram que o mais freqüente foi *Fusarium* spp., que atingiu mais as unhas dos pés do sexo feminino. Apenas 40% do total de pacientes evoluíam para cura após o tratamento e não houve nenhum registro de *Scytalidium* spp assim como na Turquia (Hilmioglu-Polat *et al.*, 2005). Na Grécia, os FFND foram responsáveis por 9.4% das onicomicoses (Ioannidou *et al.*, 2006).

Um estudo epidemiológico realizado na Tailândia, envolvendo 10000 pacientes atendidos em clínicas dermatológicas observou-se que mais da metade dos pacientes com lesões clinicamente compatíveis com *Tinea pedis* ou onicomicoses tinham infecção por FFND. *Scytalidium dimidiatum* (34,8% dos casos de onicomicoses) e *Fusarium* spp. (16,3% dos casos de onicomicoses) foram os únicos FFND isolados no estudo, em contraste com estudos europeus onde *Aspergillus* spp. e *Scopulariopsis brevicaulis* foram isolados (Ungpakorn, 2005).

No Teerã, no período de 1 ano, entre 410 casos de onicomicoses, 11,5% foram causados por FFND e 40,5% por dermatófitos. Entre as infecções por FFND, a maioria localizava-se nas unhas dos pés e *Aspergillus* spp. foi o agente mais isolado (Bassiri-Jahromi *et al.*, 2010). Em contraste, em Isfahan, também no Irã, o local mais acometido foram as unhas das mãos e o grupo mais isolado foi o de leveduras (57,7%) seguido por FFND (28,4%) e dermatófitos (13,9%). Em comum, tiveram a prevalência de *Aspergillus* spp. entre os FFND (Chadeganipour *et al.*, 2009). No norte da Índia 49,5% das onicomicoses foram causadas por dermatófitos; 40,4% por leveduras e 10,1% por FFND (Sarma *et al.*, 2008).

Na maior parte dos estudos, *T. rubrum* destaca-se como o dermatófito mais isolado das onicomicoses, entretanto no Irã, os fungos mais isolados foram *T. verrucosum* e *T. interdigitale*; a espécie *T. rubrum* apareceu em apenas 7% dos casos. O que talvez possa ser explicado pelo intenso manejo de rebanho de ovelhas (forte atividade econômica da região), que predispõe ao contato com tais fungos prevalentes (Kazemi, 2007).

Na Colômbia, 183 casos de onicomicose foram confirmados em um total de 299 pacientes. Tanto em homens quanto em mulheres as unhas dos pés foram as mais atingidas. Quanto à etiologia, as leveduras predominaram em mulheres e os dermatófitos em homens. Foram isolados FFND das unhas dos pés, sendo os mais freqüentes *Fusarium* spp. e *Scytalidium dimidiatum* (Alvarez *et al.*, 2000).

### **3.6 Tratamento das onicomicoses**

As onicomicoses são as micoses superficiais mais difíceis de serem tratadas. O sucesso do tratamento depende da adesão do paciente, do grau de acometimento e do diagnóstico correto, já que há diferenças na suscetibilidade fúngica a drogas. As unhas infectadas apresentam aparência ruim, tornam-se feias, descoloridas, espessas e distróficas, levando à impactos negativos na vida social do paciente. No passado, o tratamento consistia na extração cirúrgica da unha atingida, que pode ser extremamente traumática e dolorida. Atualmente, a doença é tratada com antifúngicos de uso oral e tópico (Shivakumar *et al.*, 2010).

O tratamento das infecções fúngicas é mais complexo que as bacterianas, sobretudo nos pacientes imunodeprimidos, devido ao escasso número de antifúngicos disponíveis, às reações adversas e à progressiva aparição de resistência tanto em leveduras como em fungos filamentosos. A fim de sanar esses problemas, cada vez mais utiliza-se a associação de antifúngicos, que pode ampliar o espectro de ação das drogas, reduzir as doses, a duração do tratamento, evitar o aparecimento de resistência e potencializar a ação antifúngica. A interação dos antifúngicos depende da cepa, pois uma mesma combinação pode ser sinérgica ou antagônica (Cantón *et al.*, 2004).

Apesar de agentes sistêmicos terem altas taxas de sucesso no tratamento, as falhas ocorrem em 20 a 25%. Entre as possíveis razões podem estar as interações antagonistas entre drogas e fatores inerentes ao paciente, como as respostas imunológicas, doença de base e não adesão ao tratamento (Sarifakioglu *et al.*, 2007). As unhas das mãos podem apresentar taxas de cura muito maiores do que as unhas dos pés, devido ao seu crescimento mais rápido. Da mesma forma, o regime de tratamento sugerido é mais curto para a infecção das unhas das mãos que para as unhas dos pés (Gupta *et al.*, 2008).

FFND, geralmente, não respondem bem à terapia comum, necessitando de remoção da unha seguida de tratamento tópico a fim de se obter melhores resultados (Welsh *et al.*, 2010).

Outro fator que contribui para a dificuldade de tratamento é a não clareza em relação à correlação entre a resistência *in vitro* e a resposta terapêutica (Sarifakioglu *et al.*, 2007).

### **3.6.1 Antifúngicos**

Ergosterol, um análogo do colesterol, é o principal esterol da membrana plasmática fúngica e exerce funções celulares importantes, como fluidez e integridade da membrana. Muitas enzimas ligadas à membrana também dependem do ergosterol para a manutenção da conformação da membrana, condições cruciais para o crescimento e divisão celular, (Martinez-Rossi *et al.*, 2008).

Os principais antifúngicos utilizados no tratamento das onicomicoses, terbinafina, itraconazol e cetoconazol, apresentam semelhantes mecanismos de ação, agindo inibindo a via de biossíntese do ergosterol na célula fúngica, levando a perda da integridade da membrana, o comprometimento do metabolismo e eventual morte celular. No entanto, drogas diferentes atuam em pontos distintos da via (Evans, 2003).

### **3.6.1.1 Terbinafina**

A primeira alilamina aprovada para o tratamento oral de onicomicose e também a mais eficaz, foi desenvolvida em 1979. Antimicótico fungicida mais potente *in vitro* contra dermatófitos, apresenta efeito fungistático contra alguns FFND e leveduras. Atua pelo bloqueio da síntese do ergosterol inibindo a ação da enzima esqualeno epoxidase e levando ao acúmulo de esteróis tóxicos e à depleção do ergosterol (Gupta *et al.*, 2003; Evans, 2003; Johnson *et al.*, 2010; Torrez-Rodríguez *et al.*, 1998; Carazo *et al.*, 1999). Essa droga é fortemente lipofílica e distribui-se bem na pele, gordura e nas unhas (Welsh *et al.*, 2010; Evans, 2003).

A terbinafina apresenta máximo nível de absorção em duas horas. Difunde-se na unha via leito ungueal e matriz, aparecendo nos fragmentos de unhas após 7 dias de administração. Níveis terapêuticos da droga persistem por até 6 meses após o término do tratamento (Elewski, 1998; Palácio *et al.*, 2002) .

A terbinafina sofre metabolismo hepático intenso pelas enzimas do citocromo P450 e cerca de 70% são excretados nas fezes (Welsh *et al.*, 2010; Evans, 2003). Os efeitos adversos estão relacionados a sintomas gastrintestinais, como náusea, diarreia e dor. Os relatos de hepatotoxicidade são raros, mas podem ocorrer (Evans, 2003).

### **3.6.1.2 Ciclopirox olamina**

Ciclopirox olamina é uma hidroxipiridona derivada que difere de outros antifúngicos na estrutura e no mecanismo de ação. Atua através da quelatação de cátions de

metais trivalentes, como o  $\text{Fe}^{3+}$ , com o qual possui alta afinidade. Esse cátion possui efeito inibidor sobre os citocromos que desempenham papel no transporte de elétrons mitocondrial e na produção de energia. Ciclopirox olaminatambém inibe enzimas metal-dependentes, como a catalase e peroxidase, que participam da degradação intracelular de elementos tóxicos (Gupta, 2001). Também inibe o transporte de elementos essenciais dentro da célula fúngica bem como a absorção de nutrientes, resultando na diminuição de nucleotídeos e redução da síntese protéica (Welsh *et al.*, 2010; Carazo *et al.*, 1999; Elkeeb *et al.*, 2010; Alberts *et al.*, 2004). Possui amplo espectro contra dermatófitos e alguns não-dermatófitos (Elkeeb *et al.*, 2010).

O ciclopirox olaminaa 8% em esmalte foi aprovado nos EUA para uso em onicomicoses podais em 1999. Após a evaporação do solvente, a concentração do agente ativo na unha aumenta para 34,8% (Alberts *et al.*, 2004). Apresenta eficácia no tratamento de onicomicose nas formas leves a moderadas, onde não há acometimento da lúnula (Elkeeb *et al.*, 2010). O uso tópico tem a vantagem de não apresentar efeitos adversos sistêmicos; o efeito relatado é uma irritação periungueal (Evans, 2003).

### 3.6.1.3 Azólicos

São fármacos lipofílicos que atuam alterando a membrana da célula fúngica inibindo a síntese do ergosterol (Carazo *et al.*, 1999). Atuam primariamente pela inibição da 14 $\alpha$ -demetilase do citocromo P450, enzima responsável pela conversão do lanosterol a 14 $\alpha$ -dimtillanosterol, na biossíntese do ergosterol. Essa inibição leva à interferência na permeabilidade da membrana, que passa a ter ergosterol substituído por esteróis considerados tóxicos. Também agem modificando a síntese de lipídeos e inativando enzimas do processo oxidativo dos fungos (Martinez, 2006).

Os triazólicos tem maior afinidade com a enzima fúngica do que com a de mamíferos, garantindo maior segurança no tratamento. O uso de imidazólicos é limitado para o tratamento de micoses superficiais, enquanto os triazólicos são usados também no tratamento de infecções fúngicas invasivas (Chen *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 2003).

Os azólicos são amplamente utilizados e representam o grupo de antifúngicos mais numeroso. Os mais usados no tratamento de onicomicose são o cetoconazol (um imidazólico) e o itraconazol (um triazólico).

O Cetoconazol foi desenvolvido na década de 80 e foi o primeiro imidazólico oral com espectro de ação relativamente amplo, incluindo os fungos dermatófitos, algumas leveduras e FFND. Entretanto para proporcionar melhora ou cura da onicomicose é necessário longo tempo de tratamento. As reações adversas incluem hepatotoxicidade, reação de hipersensibilidade, náuseas, vômito, cefaléia, entre outros (Elewski, 1998).

O itraconazol é um triazólico sintético de amplo espectro, desenvolvido no fim dos anos 80. É altamente lipofílico e é metabolizado no fígado (Welsh *et al.*, 2010; Palácio *et al.*, 2002). Foi aprovado em 1995 para o tratamento de onicomicoses, apresenta alta afinidade com a queratina e é rapidamente absorvido atingido picos de absorção dentro de 4 horas (Evans, 2003; Elewski, 1998; Llambrich *et al.*, 2002; Carazo *et al.*, 1999).

Apresenta um máximo de biodisponibilidade oral, aproximadamente 56%. Itraconazol é rapidamente eliminado da circulação sistêmica dentro de 7 a 10 dias e é excretado na urina (35%) e fezes (54%). Itraconazol chega ao local da infecção dentro de 24 horas após a administração. Após a interrupção do tratamento itraconazol ainda persiste na unha por 9 meses (Elewski, 1998).

Apesar de ser indicado contra dermatofitoses ungueais, tem atividade contra leveduras e outros fungos filamentosos incluindo *Aspergillus* spp. (Chent *et al.*, 2007).

Tem baixa incidência de efeitos adversos, baixo acometimento das funções do fígado. (Evans, 2003) As reações adversas mais comuns são incômodos como náuseas distúrbios gastrintestinais e cefaléia (Elewski, 1998).

### **3.6.2 Tratamento sistêmico**

O tratamento sistêmico da onicomicose consiste da administração oral dos

antifúngicos por vários meses até a cura, resistência ou efeitos adversos aparecerem. A principal droga sistêmica aprovada e amplamente utilizada são as alilaminas e os azólicos (Welsh *et al.*, 2010).

Drogas antifúngicas apresentam-se mais eficazes quando usadas sistemicamente, mas também aumentam os riscos de reações adversas. Antifúngicos mais recentes, como terbinafina e itraconazol, são mais seguros, mas também apresentam altas taxas de falha terapêutica (30 – 50%) (Baran *et al.*, 2005).

Seguida à administração oral, a droga é absorvida pela circulação e se difunde na placa ungueal através do leito. Cerca de 20% dos pacientes não respondem bem ao tratamento oral levando à recidiva. Além disso, a terapia oral é associada à reações adversas (Shivakumar *et al.*, 2010).

O regime de terapia oral se dá da seguinte forma: terbinafina 250 mg/dia por 12 semanas (unhas dos pés) ou 6 semanas (unhas das mãos); ou itraconazol 200mg duas vezes aos dia como terapia de pulso (1 pulso: 1 semana de itraconazol, seguida de 3 semanas sem itraconazol), usando 2 pulsos para as onicomicoses das mãos e 3 pulsos no tratamento das onicomicoses dos pés (Gupta *et al.*, 2008).

Antifúngicos orais como terbinafina, itraconazol e fluconazol são amplamente utilizados, mas devido à suas interações medicamentosas e a efeitos colaterais, há uma clara necessidade do uso de drogas antifúngicas que possam ser administradas por via tópica, seja em monoterapia ou em combinação com antifúngicos por via oral, de modo a alcançar maiores taxas de cura clínica e micológica (Schaller *et al.*, 2009).

### **3.6.3 Tratamento Tópico**

A terapia tópica é altamente desejável, pois direciona sua ação para o local da infecção, minimizando efeitos colaterais e melhorando a adesão do paciente (Elkeeb *et al.*, 2010; Baran *et al.* 2005; Gunt *et al.*, 2007).

Apesar de os agentes tópicos terem ação na área infectada, ainda assim essas áreas podem ser inatingíveis e a manutenção da concentração efetiva é dificultada,

pois a unha é compacta, dura e algumas vezes impermeável, restringindo o acesso das drogas ao agente causador da onicomicose (Gupta *et al.*, 2004).

A chave do tratamento de onicomicoses é a liberação e manutenção da concentração efetiva da droga nas camadas mais profundas da unha. Na maioria das vezes, as soluções tópicas e cremes são facilmente removidos, prejudicando a liberação da droga para o tecido subungueal. Os recentes avanços na tecnologia em relação à liberação transungueal levaram à introdução de esmaltes antifúngicos (Gunt *et al.*, 2007). A penetração pode ser melhorada pela aplicação de um verniz como veículo, que é volátil, evapora e deixa um filme que concentra a droga na superfície ungueal e a hidrata, aumentando a difusão da droga (Gupta *et al.*, 2008; Elkeeb *et al.*, 2010; Baran *et al.*, 2007; Baran *et al.*, 2005). A maioria das preparações de esmalte é baseada em resinas insolúveis em água que tem potencial limitado para liberação transungueal da droga (Shivakumar *et al.*, 2010). A água é o principal componente capaz de melhorar a plasticidade da unha. Uma vez hidratada, a unha se torna mais permeável para aplicação de substâncias tópicas (Gunt *et al.*, 2007). Considerando isso, esmaltes baseados em água têm sido preferidos, pois promovem a hidratação da unha e a difusão da droga (Shivakumar *et al.*, 2010).

O componente ativo contido no verniz é mantido na unha por um polímero, permitindo penetração através da queratina do leito ungueal. O esmalte de ciclopirox olamina 8% é o único aprovado nos Estados Unidos para tratamento de onicomicose nas formas leve a moderada, sem acometimento da lúnula (Gupta *et al.*, 2004; Evans, 2003; Llambrich *et al.*, 2002). Estudos com esse esmalte demonstraram taxa de cura que varia de 47 – 67% (Shemer *et al.*, 2010).

O tratamento tópico supre a maioria das limitações. Entretanto, devido à pobre difusão da droga na placa ungueal altamente queratinizada e à longa duração desse tipo de tratamento, a monoterapia tópica tem sido recomendada nos estágios primários da doença ou quando o tratamento sistêmico contra-indicado (Shivakumar *et al.*, 2010).

### 3.6.4 Uso combinado de antifúngicos

O tratamento de onicomicoses usando combinação de drogas é uma terapia viável que pode melhorar a taxa de cura, reduzir a duração do tratamento e a recidiva. A teoria do tratamento combinado, é que o agente oral atinge o fungo via leito ungueal e o tópico é absolvido através da superfície da unha. Se os antifúngicos em questão tiverem efeito sinérgico o tratamento será mais eficaz. Além disso, a terapia combinada propicia a complementação das rotas de liberação da droga (Evans, 2003; Welsh *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2008).

Dadas as dificuldades de tratamento das onicomicoses, os resultados dos estudos realizados permitem estabelecer o enfoque terapêutico na terapia combinada, associando tratamento tópico com tratamento oral (Llambrich *et al.*, 2002).

O uso de drogas combinadas pode apresentar efeitos sinérgicos, aditivos, indiferentes ou antagônicos, mensurados pelo índice de fração de concentração inibitória (IFCI), obtido pelo seguinte cálculo:  $(CIM_{\text{DROGA A EM COMBINAÇÃO}} / CIM_{\text{DROGA A SOZINHA}}) + (CIM_{\text{DROGA B EM COMBINAÇÃO}} / CIM_{\text{DROGA B SOZINHA}})$ . Quando  $IFCI \leq 0.5$  a interação é considerada sinérgica, se  $IFCI > 0.5$  ou  $IFCI \leq 4$  e se  $IFCI > 4$  a interação é considerada antagônica entre as drogas (Santos *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2004).

Dentre os mecanismos propostos para o sinergismo de antifúngicos, encontra-se a inibição de diferentes estágios de uma mesma via de biossíntese, o aumento da penetração de um antifúngico como resultado de dano na parede ou na membrana celular por atividade de outra droga e/ou a inibição simultânea pela inibição em diferentes alvos, parede e membrana, por exemplo enquanto uma droga atua na membrana celular uma outra atua na parede ou em outro alvo da célula. Já para o antagonismo, as hipóteses são a ação direta dos antifúngicos no mesmo sítio de atuação que pode resultar na diminuição da habilidade do outro exercer seu efeito competitivo ou mudar seu alvo, a adsorção na superfície das células por um agente que inibe a ligação de outro agente antifúngico para que exerça sua atividade em seu sítio-alvo e a menor suscetibilidade de um patógeno aos efeitos de um antifúngico devido à modificação de seu sítio-alvo por outro agente (Johnson *et al.*, 2004).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Pacientes

Os pacientes atendidos no setor de dermatologia do Hospital Universitário Cassiano Antonio de Moraes (HUCAM) com lesão sugestiva de onicomicose foram encaminhados ao Laboratório de Micologia Clínica do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) para coleta dos espécimes clínicos.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa/CBM/UFES em 08 de Março de 2006 e os pacientes foram dispensados da assinatura do termo de consentimento para a realização dos exames.

### 4.2 Coleta do material clínico

As amostras dos pacientes foram coletadas através de raspagem e/ou fragmentação da unha. Caso iniciado algum tipo de tratamento com antifúngico, os pacientes eram previamente orientados à interrupção do uso pelo menos 15 dias antes da coleta.

### 4.3 Exame micológico

Após tratamento (processo de clarificação) com KOH a 20%, o material coletado foi submetido a exames microscópicos direto para pesquisa de estruturas fúngicas. Para isolamento de fungos, os espécimes clínicos foram semeados em ágar Sabouraud glicose, adicionado de 0,05 mg mL<sup>-1</sup> de cloranfenicol e em ágar Sabouraud glicose, adicionado de cloranfenicol e cicloheximida (Mycosel®). A semeadura foi em triplicata para cada tipo de meio. A incubação se deu por um período de até 15 dias, a 28°C. A identificação fenotípica dos fungos isolados foi baseada na observação das características **macroscópicas** (cor, tamanho, textura reverso da colônia e pigmentação do meio) e **microscópicas** dos fungos: através da “técnica do microcultivo em lâmina”, ou técnica de Riddel, onde microestruturas como hifa, micro e macroconídeos e outras estruturas típicas puderam ser observadas. Quando necessário, houve complementação com provas bioquímicas e

fisiológicas adicionais para identificação da espécie de *Trichophyton*, como urease, requerimentos nutricionais (tiamina), onde *T. rubrum* apresenta-se negativo em ambas as provas.

#### **4.4 Teste de Suscetibilidade a drogas antifúngicas (TSA)**

##### **4.4.1 Isolados**

Foram testados 45 fungos filamentosos isolados de onicomicoses, sendo 15 isolados de *Trichophyton* spp., 15 de *Fusarium* spp. e 15 de *Scytalidium* spp. Os fungos foram repicados em agar dextrose batata e mantidos à 28°C por período suficiente para produção de conídios: 7 a 15 dias para os dermatófitos (*Trichophyton* spp.) e 5 a 7 dias para os não-dermatófitos (*Fusarium* spp. e *Scytalidium* spp.)

##### **4.4.2. Meio de cultura empregado no teste**

O teste foi conduzido utilizando-se o meio RPMI 1640 com glutamina e sem bicarbonato de sódio, suplementado com glicose a 2% e pH ajustado para 7.0 com tampão MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico). O meio foi previamente esterilizado por filtração.

##### **4.4.3 Drogas antifúngicas**

Foram utilizadas as drogas Ciclopirox olamina (SBL Laboratórios Stiefel LTDA), itraconazol, cetoconazol e terbinafina (Sigma-Aldrich). A diluição dos antifúngicos se deu de acordo com recomendações contidas no documento M38-A2 (2008) do Clinical and Laboratory Standards Institute, (CLSI, previamente NCCLS). Todos os antifúngicos estavam sob a forma de sais e foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e estocados em uma concentração de 1000 µg ml<sup>-1</sup>. Foram testadas 10 concentrações para cada droga, sendo que estas variaram de 0.0035 – 2 µg ml<sup>-1</sup> para ciclopirox olamina e itraconazol; 0.007 – 4 µg ml<sup>-1</sup> para cetoconazol; e 0.06 – 32 µg ml<sup>-1</sup> para terbinafina. As distintas concentrações de drogas foram distribuídas em

microplacas de poliestireno com 96 poços e fundo chato. Estas foram congeladas a -20°C e mantidas por, no máximo, 3 meses.

#### 4.4.4 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado de acordo com recomendações do documento M38-A2 (2008) do CLSI. As colônias contidas no agar dextrose batata foram cobertas com 5ml de solução salina estéril (85%), cuidadosamente raspadas e deixadas em repouso por um período em torno de 5 minutos para a decantação dos fragmentos grandes de hifas. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para tubos estéreis, de onde foram retiradas alíquotas para contagem de conídios na câmara de Newbauer. Para contagem, uma alíquota do sobrenadante foi transferida para a superfície da câmara sob uma lamínula e analisada microscopicamente com objetiva de 40x. Para ajuste do inóculo obedeceu-se uma faixa de contagem de 100 a 400 conídios na câmara, correspondendo a contagem de 1 a 4 x 10<sup>6</sup> conídios ml<sup>-1</sup>. Após esse ajuste, as suspensões foram diluídas na proporção de 1:50 em RPMI 1640, resultando em suspensões com concentrações na faixa de 2 a 8 x 10<sup>4</sup> conídios ml<sup>-1</sup>.

#### 4.4.5 Realização do teste

A realização do teste se deu conforme documento M38-A2 (2002), onde foram adicionados 100 µl do inóculo em cada orifício contendo 100 µl da droga, sendo que uma coluna da placa foi destinada ao controle livre de droga e outra foi destinada ao controle livre de inóculo. Como controle foram utilizadas cepas padrão: *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (CIMs para fluconazol: 1-4 µg ml<sup>-1</sup>, itraconazol: 0,12-0,5 µg ml<sup>-1</sup>, cetoconazol: 0,06-0,5 µg ml<sup>-1</sup>); *Candida krusei* ATCC 6258 (CIMs para fluconazol: 16-128 µg ml<sup>-1</sup>, itraconazol e cetoconazol: 0,25-1 µg ml<sup>-1</sup>); *Trichophyton mentagrophytes* ATCC MYA-4439 (CIMs para itraconazol: 0,03-0,25 µg ml<sup>-1</sup>; ciclopirox: 0,5-2 µg ml<sup>-1</sup>; terbinafina 0,002-0,008 µg ml<sup>-1</sup>).

#### 4.4.6 Tempo e temperatura de incubação

As placas para teste de *Scytalidium* spp. e *Fusarium* spp. foram mantidas a 35°C por 48 horas e para teste de *Trichophyton rubrum*, a 35°C por 7 dias (Gupta *et al.*, 2003; Espinel-Ingroff, 2009). As leituras das CIM para leveduras foi com 24 e 48 horas.

#### 4.4.7 Leitura da Concentração mínima inibitória (CIM)

Para leitura da concentração mínima inibitória (CIM), foi considerado como padrão o crescimento fúngico observado no poço sem droga (controle positivo). Para cetoconazol e itraconazol foi considerada concentração inibitória mínima (CIM) aquela que inibiu 80% do crescimento do fungo em relação ao controle; para terbinafina e ciclopirox olamina, a inibição foi de 100%. A leitura das placas foi visual e espectrofotométrica, no leitor de microplaca (Thermo plate, TP reader).

#### 4.4.8 Teste de suscetibilidade antifúngica com combinação de drogas

Para realização dos testes com drogas combinadas duas a duas procedeu-se de forma já mencionada em relação ao preparo do inóculo e diluição das drogas, conforme Gupta *et al.* (2003). Para cada isolado foram utilizadas seis placas sendo uma para cada combinação: ciclopirox olamina com terbinafina, cetoconazol ou itraconazol; cetoconazol com terbinafina ou itraconazol e terbinafina com itraconazol. As faixas de concentração testadas e as respectivas combinações se deram da seguinte forma:

- Ciclopirox olamina (0.03 – 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) + terbinafina (0.06 – 32  $\mu\text{g mL}^{-1}$ );
- Ciclopirox olamina (0.03 – 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) + itraconazol (0.0035 – 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ );
- Ciclopirox olamina (0.03 – 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) + cetoconazol (0.007 – 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ );
- Terbinafina (0.06 – 32  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) + cetoconazol (0.06 – 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ );
- Itraconazol (0.0035 – 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) + cetoconazol (0.06 – 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ );
- Terbinafina (0.06 – 32  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) + itraconazol (0.03 – 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Na placa de microdiluição, tomando como exemplo a combinação de ciclopirox olamina e terbinafina, as linhas corresponderam às faixas de concentração de ciclopirox, sendo a “linha A” livre de ciclopirox; já as colunas, corresponderam às faixas de concentração de terbinafina. Dessa forma, a “linha A” expressou apenas a atividade de terbinafina e a “coluna 1” expressou apenas a atividade de ciclopirox, cuja faixa de concentração foi restrita à encontrada nos testes previamente realizados. Em cada orifício da placa foram dispensados 50 µL de cada droga. Nos orifícios em que uma das duas drogas estava ausente, o volume foi completado para 100 µL com meio RPMI 1640. As drogas foram preparadas duas vezes mais concentradas, devido à diluição em RPMI ou em outra droga. A temperatura e o período de incubação das placas foram idênticos aos mencionados no teste simples.

	1	2		4	5 - 9	10	11	12
<b>A</b>	0/0 + INÓCULO	0.06 TRB	0.125 TRB	0.25 TRB	...	16 TRB	32 TRB	RPMI
<b>B</b>	0.03 CPX	0.06+0.03	0.125+0.03	0.25+0.03	...	16+0.03	32+0.03	RPMI
<b>C</b>	0.06 CPX	0.06+0.06	0.125+0.06	0.25+0.06	...	16+0.06	32+0.06	RPMI
<b>D</b>	0.125 CPX	0.06+0.125	0.125+0.125	0.25+0.125	...	16+0.125	32+0.125	RPMI
<b>E</b>	0.25 CPX	0.06+0.25	0.125+0.25	0.25+0.25	...	16+0.25	32+0.25	RPMI + INÓCULO
<b>F</b>	0.5 CPX	0.06+0.5	0.125+0.5	0.25+0.5	...	16+0.5	32+0.5	RPMI + INÓCULO
<b>G</b>	1 CPX	0.06+1	0.125+1	0.25+1	...	16+1	32+1	RPMI + INÓCULO
<b>H</b>	2 CPX	0.06+2	0.125+2	0.25+2	...	16+2	32+2	RPMI + INÓCULO

Figura 2: Esquema da distribuição de drogas na placa de microdiluição, utilizando como exemplo a combinação entre terbinafina (TRB) e ciclopirox olamina (CPX).

#### 4.4.9 Leitura e interpretação dos resultados da combinação de drogas

A avaliação das interações foi baseada nos cálculos do índice de fracionário de concentração inibitória (IFCI), seguindo a fórmula:  $[(\text{CIM A em combinação}/\text{CIM A}) + (\text{CIM B em combinação}/\text{CIM B})]$ . De acordo com esse resultado, a interação foi definida como sinergismo se o índice FCI foi menor ou igual a 0.5; indiferente se FCI esteve entre 0.5 e 4; e antagonismo quando o índice foi maior que 4 (Gupta *et al.*, 2003; Santos *et al.* 2006).

## 5 RESULTADOS

No período de janeiro de 2009 a abril de 2011 foram atendidos, no Laboratório de Micologia Clínica do Departamento de Patologia, 431 pacientes com suspeita de dermatomicoses. Destes foram obtidas 538 amostras clínicas, sendo 287 (53,3%) positivas para fungos. Leveduras foram os fungos mais prevalentes neste estudo (53%), seguido por dermatófitos (34,8%) e FFND (12,2%) (Tabela 1). As unhas foram as superfícies mais acometidas correspondendo a 28% das unhas dos pés (79/287) e a 22% das unhas das mãos (64/287) (Tabela 1 e Figura 2).

Tabela 1: Distribuição das amostras clínicas positivas para fungos segundo a espécie isolada, o local anatómico e o sexo do paciente.

	Pé		Mão		Unha do pé		Unha da mão		Tronco		Corpo		Face		Couro cabeludo		TOTAL
	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	
<b>Fungo isolado</b>																	
<i>Malassezia</i> spp.			1						20	7	10	8	3	2	4	4	59
<i>Candida</i> spp.	3		5	2	21	2	44	10	1		2						90
<i>Trichosporon</i> spp.		1						1								1	3
<b>Leveduras (53%)</b>	<b>4</b>		<b>8</b>		<b>23</b>		<b>55</b>		<b>28</b>		<b>20</b>		<b>5</b>		<b>9</b>		<b>152</b>
<i>T. rubrum</i>	4	1	3	2	10	7	1	2			1	6					37
<i>T.interdigitale</i>	7	4			8	1	1	1		1							23
<i>Trichophyton</i> spp.	5	8							1	2	4					1	21
<i>M.canis</i>					1									1	3	5	10
<i>M. gypseum</i>			1								2	1		1			5
<i>E. floccosum</i>		1			1	1					1						4
<b>Dermatófitos (34,8%)</b>	<b>30</b>		<b>6</b>		<b>29</b>		<b>5</b>		<b>4</b>		<b>15</b>		<b>2</b>		<b>9</b>		<b>100</b>
<i>Fusarium</i> spp.					12	2	2										16
<i>Scytalidium</i> spp.	2	1			7	3	1	1									15
<i>Aspergillus</i> spp.					1	2											3
<i>Curvularia</i> spp.	1																1
<b>FFND (12,2%)</b>	<b>4</b>		<b>0</b>		<b>27</b>		<b>4</b>		<b>0</b>		<b>0</b>		<b>0</b>		<b>0</b>		<b>35</b>
<b>Subtotal</b>	<b>22</b>	<b>16</b>	<b>10</b>	<b>4</b>	<b>61</b>	<b>18</b>	<b>49</b>	<b>15</b>	<b>22</b>	<b>10</b>	<b>19</b>	<b>16</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	
<b>TOTAL</b>	<b>38</b>		<b>14</b>		<b>79</b>		<b>64</b>		<b>32</b>		<b>35</b>		<b>7</b>		<b>18</b>		<b>287</b>

F: sexo feminino / M: sexo masculino

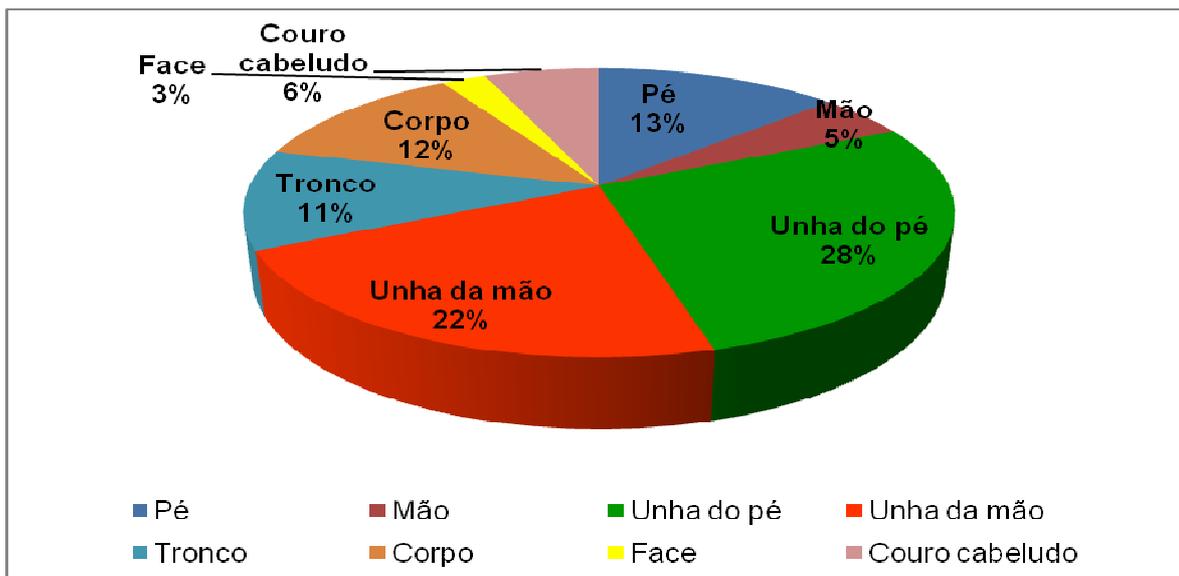


Figura 3: Frequência das dermatomicoses segundo o sítio anatômico acometido

### 5.1 Etiologia das onicomicoses

Do total de amostras coletadas, 45,2% (243/538) foram amostras ungueais, e 57,2% (139/243) destas corresponderam a exame microscópico direto e cultivo positivos para fungo (Tabela 2); resultado positivo na cultura foi obtido em 58,8% (143/243) das amostras. A Tabela 2 traz os resultados do exame direto e da cultura.

Tabela 2: Resultados do exame microscópico direto e cultura de amostras de unhas

	Cultura positiva	Cultura negativa	TOTAL
<b>Exame direto positivo</b>	139	46	185
<b>Exame direto negativo</b>	4	54	58
<b>TOTAL</b>	143	100	243

As amostras ungueais com culturas positivas (n=143) foram obtidas de 120 pacientes: 93 pacientes apresentavam onicomicoses nas unhas das mãos ou dos pés e 25, onicomicose em ambos locais. Em sua maioria, as amostras foram provenientes das unhas dos pés de mulheres. A Tabela 3 traz a distribuição quanto ao sexo e o local da lesão.

Tabela 3: Distribuição das amostras de unhas quanto ao sexo dos pacientes e ao local da lesão

	EXAMES PARA ONICOMICOSE			RESULTADOS POSITIVOS		
	Unha do pé	Unha da mão	TOTAL	Unha do pé	Unha da mão	TOTAL
Masculino	27	22	49	18	15	33
Feminino	134	60	194	61	49	110
<b>TOTAL</b>	<b>161</b>	<b>82</b>	<b>243</b>	<b>79</b>	<b>64</b>	<b>143</b>

Entre os fungos filamentosos agentes de onicomicoses, os dermatófitos foram predominantes, com maior prevalência do gênero *Trichophyton*, com as espécies *T. rubrum* e *T. interdigitale*, respectivamente, 14% (20/143) e 7,7% (11/143), totalizando 21,7%). No segundo grupo de fungos filamentosos (FFND) os gêneros mais isolados foram *Fusarium* spp. 11,2% (16/143) e *Scytalidium* spp. 8,4% (12/143) (Tabela 4).

Tabela 4: Prevalência de fungos filamentosos nas onicomicoses (de acordo com o local da lesão e com as espécies)

Espécies	Unha da mão			Unha do pé			
	Distribuição dentro dos grupos (%)	Prevalência em relação ao total de amostras (n=143)		Distribuição dentro dos grupos (%)	Prevalência em relação ao total de amostras (n=143)	Prevalência total (n=143), incluindo unhas das mãos e dos pés	
<i>T. rubrum</i>	3	60,0	2%	17	58,6	11,9%	14%
<i>T. interdigitale</i>	2	40,0	1,4%	9	31,0	6,3%	7,7%
<i>E. floccosum</i>	0	0,0	0%	2	6,9	1,4%	1,4%
<i>M. canis</i>	0	0,0	0%	1	3,4	0,7%	0,7%
<b>DERMATÓFITOS</b>	<b>5 (7,8%)</b>	<b>100,0</b>	<b>3,5%</b>	<b>29(36,7%)</b>	<b>100,0</b>	<b>20,3%</b>	
<i>Fusarium</i> spp.	2	50,0	1,4%	14	51,9	9,8%	11,2%
<i>Scytalidium</i> spp.	2	50,0	1,4%	10	37,0	7%	8,4%
<i>Aspergillus</i> spp.	0	0,0	0%	3	11,1	2%	2,1%
<b>NÃO-DERMATÓFITOS</b>	<b>4 (6,3%)</b>	<b>100,0</b>	<b>2,8%</b>	<b>27 (34,2%)</b>	<b>100,0</b>	<b>18,9%</b>	

A Figura 3 mostra que leveduras foram mais prevalentes nas unhas das mãos enquanto fungos filamentosos foram mais prevalentes nas unhas dos pés. Contudo, de acordo com a Tabela 4, em ambos locais a prevalência de dermatófitos e não-dermatófitos foi bem semelhante.

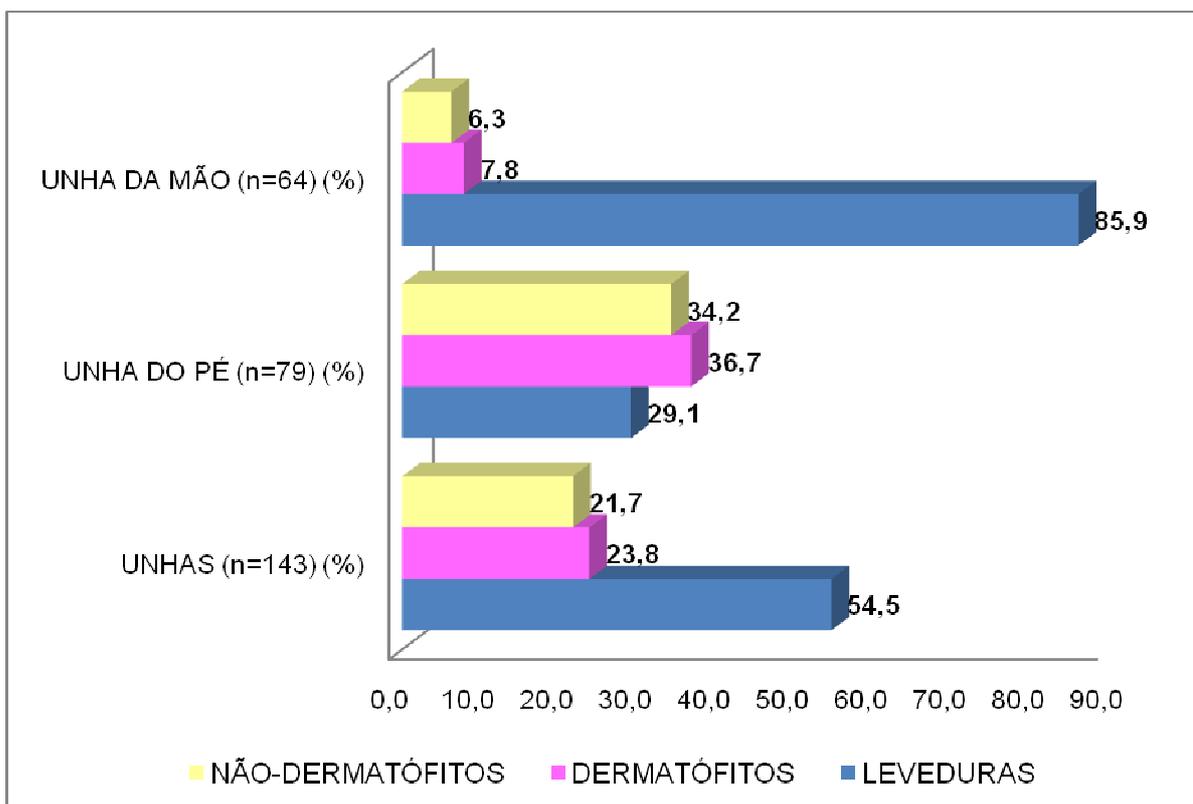


Figura 4: Distribuição dos grupos fúngicos agentes de onicomicoses de acordo com o local de isolamento

Nas mulheres, leveduras (*Candida* spp.) foi o fungo mais isolado nas unhas das mãos e dos pés (59%), mas com maior prevalência nas unhas das mãos (89,9%). Dermatófitos e FFND tiveram prevalências próximas (20 e 21%, respectivamente) Já nos homens, leveduras (*Candida* spp.) corresponderam ao segundo grupo de fungos mais isolados (36,4%), sendo precedido por dermatófitos (39,4%) enquanto que FFND corresponderam a 24,2% dos isolamentos. Também nos homens, leveduras foram mais isolados das unhas das mãos (66,7%) do que dos pés (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5: Distribuição dos grupos e espécies fúngicas de acordo com local da lesão no sexo feminino

Grupo fúngico	Fungo isolado	Unha da mão (%)	Unha do pé (%)	Total (%)
Leveduras (n=65) 59%	<i>Candida</i> spp.	44 (89,8)	21 (34,4)	65 (59,1)
	<i>T.rubrum</i>	1 (2,0)	10 (16,4)	11 (10)
Dermatófitos (n = 22) 20%	<i>T. interdigitale</i>	1 (2,0)	8 (13,1)	9 (8,2)
	<i>Epidermophyton floccosum</i>	0 (0)	1 (1,6)	1 (0,9)
	<i>Microsporum canis</i>	0 (0)	1 (1,6)	1 (0,9)
	<b>DERMATÓFITOS</b>	<b>2 (4,1)</b>	<b>20 (32,8)</b>	
FFND (n= 23) 21%	<i>Fusarium</i> spp.	2 (4,1)	12 (19,7)	14 (12,7)
	<i>Scytalidium</i> spp.	1 (2,0)	7 (11,5)	8 (7,3)
	<i>Aspergillus</i> spp.	0 (0)	1 (1,6)	1 (0,9)
	<b>NÃO-DERMATÓFITOS</b>	<b>3 (6,1)</b>	<b>20 (32,8)</b>	
	<b>TOTAL</b>	49 (100)	61 (100)	110 (100)

Tabela 6: Distribuição dos grupos e espécies fúngicas de acordo local da lesão no sexo masculino

Grupo fúngico	Fungo isolado	Unha da Mão (%)	Unha do Pé (%)	Total (%)
Levedura (n=12) 36,4%	<i>Candida</i> spp.	10 (66,7)	2 (11,1)	12 (36,4)
	<i>T.rubrum</i>	2 (13,3)	7 (38,9)	9 (27,2)
Dermatófitos (n=13) 39,4%	<i>T. interdigitale</i>	2 (13,3)	1 (5,6)	3 (9,1)
	<i>Epidermophyton floccosum</i>	0 (0)	1 (5,5)	1 (3,0)
	<i>Microsporum canis</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<b>DERMATÓFITOS</b>	<b>4 (26,6)</b>	<b>9 (50)</b>	
FFND (n=8) 24,2%	<i>Scytalidium</i> spp.	1 (6,7)	3 (16,7)	4 (12,1)
	<i>Fusarium</i> spp.	0 (0)	2 (11,1)	2 (6,1)
	<i>Aspergillus</i> spp.	0 (0)	2 (11,1)	2 (6,1)
	<b>NÃO-DERMATÓFITOS</b>	<b>1 (6,7)</b>	<b>7 (38,9)</b>	
	<b>TOTAL</b>	15 (100)	18 (100)	33 (100)

## 5.2 Testes de suscetibilidade

Para os testes de suscetibilidade foram selecionados aleatoriamente 45 isolados de fungos filamentosos, correspondendo a 15 de cada um dos gêneros *Trichophyton*, *Scybalidium* e *Fusarium*. Nestes testes foi analisada a atividade *in vitro* de quatro drogas antifúngicas (terbinafina, cetoconazol, itraconazol e ciclopirox) separadamente e em combinação entre elas.

Foi observado que o gênero *Trichophyton* (dermatófito) foi muito mais inibido *in vitro* pelas drogas terbinafina, cetoconazol e itraconazol do que FFND, apresentando valores de concentração inibitória mínima (CIM) muito baixos, no máximo até 0,125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Correspondendo a valores menores que os necessários para inibir os FFND.

Entre os FFND, as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram mais elevadas, porém com valores bem próximos para cada uma das drogas testadas. No entanto, é possível inferir que, em geral, isolados de *Scybalidium* spp. foram mais inibidos do que isolados de *Fusarium* spp. (Tabela 7).

Embora a droga ciclopirox olamina tenha apresentado valores de CIM mais baixos para fungos dermatófitos que para FFND, também se observou que para alguns isolados de *Trichophyton* a droga pode apresentar CIM tão alta quanto para isolados de FFND (Tabela 7).

Tabela 7: Faixas de variação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de quatro antifúngicos frente a três gêneros de fungos filamentosos

	Faixas de variação de CIM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )			
	TRB	CTZ	ITR	CPX
	(0.06 – 32)	(0.007 – 4)	(0.003 – 2)	(0.03 – 2)
<i>Trichophyton rubrum</i> (n=15)	0.06 – 0.125	0.007 – 0.06	0.003 – 0.06	0.06 - 2
<i>Scybalidium dimidiatum</i> (n=15)	0.5 - 16	1 – 4	1 – 2	0.5 – 2
<i>Fusarium</i> spp. (n=15)	2 - >32	4 - >4	2 - >2	2 - >2

TRB = terbinafina / CTZ= cetoconazol / ITR = itraconazol / CPX = ciclopirox olamina.

A Tabela 8 traz as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de 50 e 90% dos isolados de cada gênero (CIM50 e CIM90, respectivamente). É possível observar que terbinafina, cetoconazol e itraconazol apresentaram os mais baixos valores de CIM 50 e CIM 90 para isolados do gênero *Trichophyton* e os valores mais elevados para isolados do gênero *Fusarium* spp. Para *Scytalidium dimidiatum* os isolados também apresentaram valores de CIM elevados, porém bem menores que os valores observados para *Fusarium* e Terbinafina. Entre os fungos testados, *Fusarium* foi o menos inibido *in vitro* pelas drogas testadas

Tabela 8: Valores das CIMs 50 e 90 de quatro antifúngicos frente a três gêneros de fungos filamentosos

	TRB		CTZ		ITR		CPX	
	(0.06 – 32)		(0.007 – 4)		(0.0035 – 2)		(0.03 – 2)	
	CIM 50 ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	CIM 90 ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	CIM 50 ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	CIM 90 ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	CIM 50 ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	CIM 90 ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	CIM 50 ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	CIM 90 ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
<i>Trichophyton rubrum</i> (n=15)	0.06	0.06	0.03	0.06	0.06	0.125	0.5	1
<i>Scytalidium dimidiatum</i> (n=15)	1	2	1	1	2	2	1	1
<i>Fusarium</i> spp. (n=15)	32	32	2	>2	2	>2	2	>2

TRB = terbinafina / CTZ= cetoconazol / ITR = itraconazol / CPX = ciclopirox olamina

### 5.3 Combinação de drogas

Utilizando o cálculo de índice fracionário de concentração inibitória (IFCI) foi possível classificar os tipos de interação em sinergismo, indiferente ou antagonismo. Não houve nenhum registro de antagonismo entre as drogas testadas. Foi possível observar que a maioria das interações apresentou-se indiferentes para os fungos testados. O melhor resultado (maior sinergismo) foi apresentado pela interação entre cetoconazol e terbinafina para o fungo *Scytalidium* spp., que demonstrou sinergismo em todas as combinações, com exceção da combinação de itraconazol e

cetoconazol. O gênero *Fusarium* foi o menos inibido com as combinações de drogas, apresentando sinergismo apenas para ciclopirox olamina e terbinafina.

Tabela 9: número de sinergismos resultantes da interação de 4 antifúngicos (ITR: itraconazol / TRB: terbinafina / CTZ: cetoconazol / CPX: ciclopirox olamina) na inibição de isolados dos gêneros *Trichophyton*, *Scytalidium* e *Fusarium*

	ITR/ CPX	TRB/ CPX	CTZ/ CPX	ITR/ CTZ	ITR/ TRB	TRB/ CTZ
<i>Scytalidium</i>	40% (6/15)	13% (2/15)	13% (2/15)	0	53% (8/15)	47% (7/15)
<i>Fusarium</i>	0	27% (4/15)	0	0	0	0
<i>T. rubrum</i>	13% (2/15)	0	13% (2/15)	0	0	0
TOTAL	17.8% (8/45)	13.3% (6/45)	8.9% (4/45)	0	17.8% (8/45)	15.5% (7/45)

De todas as amostras submetidas ao teste de microdiluição combinado entre terbinafina e cetoconazol, 20% (9/45) demonstraram sinergismo; as interações entre itraconazol e terbinafina e ciclopirox olamina alcançaram o índice de 17,8% (8/45) e para a interação entre terbinafina e ciclopirox olamina esse índice chegou a 13,3% (6/45). Já para cetoconazol e ciclopirox olamina chegou a 8,9% (4/45). A interação entre itraconazol e cetoconazol apresentou-se indiferente para todos os isolados testados.

Como é possível observar nas Tabelas 10, 11 e 12, apesar de grande parte das interações entre os antifúngicos apresentarem-se como indiferentes, em alguns casos houve diminuição das CIMs quando em combinação, demonstrando potencialização do efeito dos antifúngicos, principalmente para aqueles em que a CIM foi muito elevada.

Tabela 10: Interações de Itraconazol (ITR), Terbinafina (TRB), Cetoconazol (CTZ) e Ciclopirox olamina (CPX) contra isolados de *Scytalidium dimidiatum*

ISOLADO	CIM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )				Combinação ITR/CPX		Combinação TRB/CPX		Combinação CTZ/CPX		Combinação ITR/CTZ		Combinação ITR/TRB		Combinação TRB/CTZ	
	ITR	TRB	CTZ	CPX	CIM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	IFCI										
1	1	2	1	0.5	0.5/0.125	0.5	0.5/0.03	0.3	0.5/0.125	0.8	1/1	2	0.25/0.25	0.4	0.5/0.25	0.5
2	2	16	2	2	0.25/0.125	0.2	2/0.125	0.2	0.5/0.06	0.3	2/2	2	0.5/ 4	0.5	4/0.25	0.4
3	2	0.5	4	0.5	2/0.5	2.0	0.25/0.25	1.0	4/0.5	2.0	2/4	2	2/0.5	2	0.5/4	2
4	2	8	4	2	2/2	2.0	2/2	1.3	4/2	2.0	2/4	2	0.25/2	0.4	4/0.125	0.5
5	2	8	4	1	0.5/1	1.3	1/1	1.1	1/1	1.3	2/4	2	0.5/2	0.5	2/1	0.5
6	2	1	2	1	0.06/0.5	0.5	0.125/0.5	0.6	0.5/0.5	0.8	2/4	2	0.06/0.25	0.3	0.125/1	0.6
7	2	2	2	1	0.25/0.06	0.2	2/1	2.0	2/1	2.0	2/2	2	2/1	1.5	1/2	1.5
8	2	0.5	2	1	2/1	2.0	0.25/1	1.5	2/1	2.0	2/2	2	0.25/0.125	0.4	0.125/0.5	0.5
9	1	1	4	0.5	1/0.25	1.5	0.5/0.25	1.0	1/0.25	0.8	1/4	2	0.06/0.25	0.3	0.25/0.5	0.4
10	2	1	4	0.5	0.5/0.25	0.8	0.5/0.25	1.0	2/0.25	1.0	2/4	2	1/0.25	0.8	0.25/0.25	0.3
11	2	1	4	0.5	0.5/0.25	0.8	0.5/0.06	0.6	0.125/1	2.0	2/4	2	0.5/0.5	0.8	0.5/0.06	0.5
12	2	1	4	1	0.25/0.03	0.2	0.5/0.25	0.8	4/1	2.0	2/4	2	2/1	2	1/2	1.5
13	2	2	4	1	0.125/0.03	0.1	1/0.5	1.0	4/1	2.0	2/4	2	0.5/0.5	0.5	0.25/1	0.4
14	>2	1	4	1	2/0.5	1.5	1/0.03	1.0	2/0.5	1.0	2/4	2	2/1	2	1/2	2
15	2	1	4	1	0.125/0.5	0.6	0.125/0.5	0.6	0.03/0.5	0.5	2/4	2	0.125/0.5	0.6	0.5/4	1.5
<b>Total de IFCI correspondente a sinergismo</b>					<b>40% (6/15)</b>		<b>13% (2/15)</b>		<b>13% (2/15)</b>		<b>0</b>		<b>53% (8/15)</b>		<b>47% (7/15)</b>	

CIM: concentração inibitória mínima / IFCI: índice fracionário de concentração inibitória / IFCI <0.5 indica sinergismo; IFCI >0.5 e <4 indica indiferença; IFCI >4 indica antagonismo

Tabela 11: Interações de Itraconazol (ITR), Terbinafina (TRB), Cetoconazol (CTZ) e Ciclopirox olamina (CPX) contra isolados de *Fusarium*

ISOLADO	CIM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )				Combinação ITR/CPX		Combinação TRB/CPX		Combinação CTZ/CPX		Combinação ITR/CTZ		Combinação ITR/TRB		Combinação TRB/CTZ	
	ITR	TRB	CTZ	CPX	CIM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	IFCI										
1 <sup>A</sup>	2	16	4	2	2/2	2.0	2/0.03	0.1	4/2	2.0	2/4	2	2/16	2	4/2	0.8
2 <sup>B</sup>	2	16	4	2	2/2	2.0	4/0.5	0.5	4/2	2.0	2/4	2	2/16	2	16/4	2
3 <sup>B</sup>	2	32	4	2	2/2	2.0	16/0.06	0.5	4/2	2.0	2/4	2	2/32	2	32/4	2
4 <sup>B</sup>	>2	16	>4	>2	>2/>2	2.0	4/0.06	0.3	>4/>2	2.0	2/4	2	2/32	3	16/4	2
5 <sup>B</sup>	2	32	4	2	2/2	2.0	32/2	2.0	4/2	2.0	2/4	2	2/32	2	32/4	2
6 <sup>B</sup>	2	2	4	2	2/2	2.0	2/2	2.0	4/2	2.0	2/4	2	0.125/1	0.6	1/0.5	0.6
7 <sup>B</sup>	2	32	4	2	2/2	2.0	32/2	2.0	4/2	2.0	2/4	2	2/32	2	32/4	2
8 <sup>A</sup>	2	32	4	2	2/2	2.0	32/2	2.0	4/2	2.0	2/4	2	2/32	2	32/4	2
9 <sup>B</sup>	2	32	4	2	2/2	2.0	32/1	1.5	4/2	2.0	2/4	2	2/32	2	32/4	2
10 <sup>B</sup>	>2	2	>4	2	>2/>2	2.0	1/1	1.0	4/2	2.0	2/4	2	2/2	2	2/4	2
11 <sup>B</sup>	>2	>32	>4	>2	>2/>2	2.0	>32/>2	2.0	>2/>2	1.5	2/4	2	2/32	2	32/4	2
12 <sup>B</sup>	>2	32	>4	2	>2/>2	2.0	32/2	2.0	>4/>2	2.0	2/4	2	2/32	2	32/4	2
13 <sup>B</sup>	>2	8	>4	>2	>2/>2	2.0	8/2	2.0	1/1	0.8	2/4	2	2/8	2	8/4	2
14 <sup>B</sup>	>2	>32	>4	>2	>2/>2	2.0	>32/>2	2.0	>4/>2	2.0	2/4	2	2/32	2	32/4	2
15 <sup>B</sup>	>2	>32	>4	>2	>2/>2	2.0	8/2	1.3	>4/>2	2.0	2/4	2	2/32	2	32/4	2
<b>Total de IFCI correspondente a sinergismo</b>					<b>0</b>		<b>27% (4/15)</b>		<b>0</b>		<b>0</b>		<b>0</b>		<b>0</b>	

<sup>A</sup> *F. oxysporum* / <sup>B</sup> *F. solani* / CIM: concentração inibitória mínima / IFCI: índice fracionário de concentração inibitória / IFCI <0,5 indica sinergismo; IFCI >0,5 e <4 indica indiferença; IFCI >4 indica antagonismo

Tabela 12: Interações de Itraconazol (ITR), Terbinafina (TRB), Cetoconazol (CTZ) e Ciclopirox olamina (CPX) contra isolados de *T. rubrum*

ISOLADO	CIM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )				Combinação ITR/CPX		Combinação TRB/CPX		Combinação CTZ/CPX		Combinação ITR/CTZ		Combinação ITR/TRB		Combinação TRB/CTZ		
	ITR	TRB	CTZ	CPX	CIM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	IFCI	CIM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	IFCI	CIM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	IFCI	CIM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	IFCI	CIM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	IFCI	CIM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	IFCI	
1	0.06	0.06	0.03	0.5	0.06/0.5	2	0.06/0.03	1.1	0.03/0.5	2	0.003/0.03	1	0.015/0.06	1.3	0.06/0.03	2	
2	0.06	0.06	0.06	1	0.06/1	2	0.06/0.03	1	0.03/0.06	0.5	0.003/0.06	1	0.06/0.03	1.5	0.06/0.06	2	
3	0.06	0.06	0.06	1	0.06/1	2	0.06/0.03	1	0.06/0.25	1.3	0.003/0.06	1	0.015/0.06	1.3	0.06/0.06	2	
4	0.003	0.06	0.015	0.06	0.003/0.03	1.5	0.06/0.03	1.5	0.015/0.06	2	0.003/0.015	2	0.003/0.06	2	0.06/0.007	1.5	
5	0.015	0.06	0.015	1	0.015/0.125	1.1	0.06/0.03	1	0.007/0.06	0.1	0.003/0.015	1.2	0.015/0.06	2	0.06/0.015	2	
6	0.007	0.06	0.06	0.125	0.007/0.125	2	0.06/0.125	2	0.06/0.125	2	0.003/0.03	0.9	0.003/0.06	1.4	0.06/0.015	1.3	
7	0.25	0.06	0.125	0.5	0.06/0.25	0.7	0.06/0.5	2	0.125/0.5	2	0.03/0.125	1.1	0.03/0.03	0.6	0.03/0.06	1	
8	0.06	0.06	0.03	0.5	0.06/0.25	1.5	0.06/0.03	1.1	0.03/0.5	2	0.03/0.015	1	0.015/0.06	1.3	0.06/0.015	1.5	
9	0.015	0.06	0.03	0.125	0.007/0.125	1.5	0.06/0.125	2	0.03/0.125	2	0.007/0.03	1.5	0.015/0.06	2	0.06/0.03	2	
10	0.03	0.06	0.015	2	0.015/0.06	0.5	0.06/0.03	1	0.007/1	1	0.003/0.015	1.1	0.015/0.06	1.5	0.06/0.015	2	
11	0.06	0.125	0.125	0.125	0.06/0.125	2	0.06/0.03	0.7	0.125/0.125	2	0.03/0.06	1	0.03/0.06	1	0.06/0.06	1	
12	0.03	0.06	0.015	2	0.015/0.06	0.5	0.06/0.03	1	0.007/1	1	0.03/0.015	2	0.03/0.06	2	0.06/0.015	2	
13	0.06	0.06	0.06	0.5	0.06/0.5	2	0.03/0.5	2	0.06/0.5	1	0.003/0.06	1	0.03/0.06	1.5	0.06/0.06	2	
14	0.03	0.06	0.125	1	0.03/1	2	0.06/0.5	1.5	0.06/0.5	1	0.007/0.125	1.2	0.03/0.06	2	0.06/0.06	1.5	
15	0.03	0.06	0.06	0.5	0.03/0.5	2	0.06/0.5	2	0.06/0.5	2	0.003/0.06	1.1	0.03/0.06	2	0.06/0.06	2	
<b>Total de IFCI correspondente a sinergismo</b>					<b>13% (2/15)</b>	<b>0</b>			<b>13% (2/15)</b>	<b>0</b>			<b>0</b>	<b>0</b>			<b>0</b>

CIM: concentração inibitória mínima / IFCI: índice fracionário de concentração inibitória / IFCI <0,5 indica sinergismo; IFCI >0,5 e <4 indica indiferença; IFCI >4 indica antagonismo

## 6 DISCUSSÃO

Onicomicoses são micoses superficiais de difícil tratamento e comprometem a qualidade de vida dos pacientes. Cada vez mais comuns, representam cerca de 50% dos problemas ungueais, atingindo de 2 – 3% da população mundial (Baran *et al.*, 2005).

Dentre as micoses superficiais diagnosticadas neste estudo, as ungueais foram as mais frequentes (50%), resultado semelhante ao encontrado por outros autores (Oliveira *et al.*, 2003; Campanha *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2007; Wille *et al.* 2009; Alvarez *et al.* 2004). A alta prevalência das onicomicoses pode ser explicada pela dificuldade do tratamento e pela recidiva, pois falhas terapêuticas podem chegar a 25% (Sarifakioglu *et al.*, 2007).

Em ambos os sexos, a maior frequência de onicomicose nas unhas dos pés, pode ser explicada pelo crescimento mais lento dessas unhas e pela constante exposição a traumas, principalmente gerada pelo uso de calçados fechados (Baran *et al.*, 2005). O fato de o sexo feminino ter prevalecido, em relação ao masculino, pode estar relacionado à maior preocupação das mulheres com a aparência das unhas, levando à maior busca pelo diagnóstico/tratamento; ou pode representar uma real maior incidência devido ao hábito de frequentar salões de beleza, onde suas unhas, além de terem a cutícula retirada (possibilitando porta de entrada para microrganismos), ainda estão mais sujeitas ao contato direto com instrumentos contaminados. O acometimento mais frequente das unhas dos pés pode ter relação com o uso de sapatos fechados do tipo bico fino que favorece o trauma e conseqüentemente o aparecimento de onicomicose.

Peron *et al.* (2005) observaram na região de Paranavaí, Paraná, que as unhas constituíam apenas 13,2% das amostras positivas para dermatomicoses, sendo as micoses superficiais na pele as predominantes. Da mesma forma, Jain *et al.* (2008) observaram que *Tinea unguium* foi a dermatofitose menos frequente, prevalecendo a *Tinea corporis*. Resultados encontrados em Pernambuco mostraram que dermatofitoses de menor frequência foram as ungueais e que o dermatófito predominante foi *T.interdigitale* (Damázio *et al.*, 2007).

Nossos resultados demonstraram que enquanto os fungos filamentosos foram mais isolados das unhas dos pés, leveduras foram mais isoladas nas unhas das mãos, em ambos os sexos. A diferença de prevalência entre os grupos pode ser relacionada aos hábitos dos pacientes e às exigências para o crescimento dos fungos. A prevalência de leveduras nas unhas das mãos pode estar relacionada com hábitos que favorecem a manutenção da umidade nas mãos, criando ambiente favorável para invasão por *Candida* spp. Em domésticas, por exemplo, o contato freqüente com água e detergente danifica a cutícula e favorece a entrada de fungos (Surjusshe *et al.*, 2007).

Na distribuição dos grupos fúngicos causadores de onicomicoses, as leveduras foram mais prevalentes (54,5%), seguidas de filamentosos dermatófitos (23,8%) e FFND (21,7%). Esses resultados merecem atenção principalmente devido à alta prevalência de FFND, antes considerados contaminantes, mas que hoje recebem atenção não só pelo aumento de sua freqüência, mas também pela dificuldade do tratamento que é associada e este grupo.

Igualmente, na Colômbia, em um total de 103 isolados positivos para onicomicoses, foram identificadas 56% de leveduras, 29% de dermatófitos e 15% de FFND (Bueno *et al.*, 2009). Em outro estudo na Colômbia, 2496 isolados de onicomicose foram examinados em um período de 10 anos; 12,4% dos isolados corresponderam a FFND, dos quais 50% pertenciam ao gênero *Fusarium* spp., 31%, a *Scytalidium* spp. e 19% a outros gêneros, incluindo *Aspergillus* spp. (Escobar *et al.*, 2003).

Da mesma forma, Hashemi *et al.* (2009) encontraram em 216 amostras de unha as proporções de 59,7% de leveduras, 21,3% de dermatófitos e 19% de FFND. No entanto, ao contrário do nosso estudo, neste prevaleceu o acometimento das unhas das mãos.

No entanto, essa prevalência entre agentes de onicomicoses pode variar bastante. No Irã as leveduras também foram mais prevalentes, mas dermatófitos foram menos prevalentes que FFND, que corresponderam a 28,4% dos isolados (Chadeganipour *et al.*, 2009).

Estudos na Alemanha, Itália e Índia, além de apresentarem menor prevalência de FFND, ainda diferem em relação às leveduras, que normalmente aparecem como o

segundo grupo mais freqüente, precedido pelo grupo dos dermatófitos (Mügge *et al.*, 2006; Romano *et al.*, 2005; Gianni *et al.*, 2000; Sarma *et al.*, 2008).

Ghannoum *et al.* (2000) também demonstraram a prevalência de dermatófitos (59%) na América do Norte, todavia, FFND e leveduras apresentaram prevalência semelhante (aproximadamente 20% cada).

Em pesquisa realizada com um grupo de estudantes universitários, em São Paulo, apenas dermatófitos foram isolados; a não ocorrência de leveduras ou FFND talvez possa ser justificada pelo fato desse grupo não ter hábitos domésticos ou contato direto com solo e vegetais (Siqueira *et al.*, 2006).

Em se tratando apenas de fungos filamentosos, a freqüência de dermatófitos e FFND ficou bem próxima, justificando a crescente atenção voltada para estes fungos, antes considerados meros contaminantes e, hoje reconhecidos pela capacidade que apresentam de degradar a queratina das unhas, ainda que de forma mais lenta e menos eficaz que os dermatófitos, mas suficiente para invadirem os tecidos. Esse crescente aparecimento de FFND desperta maior atenção no momento do diagnóstico micológico, pois podem ser considerados potenciais invasores e não apenas contaminantes, demandando o estabelecimento de critérios mais rigorosos para o diagnóstico laboratorial.

Nas unhas dos pés de mulheres houve proporção semelhante entre os dois grupos de fungos filamentosos, com destaque para *Fusarium* spp., que foi o gênero de fungo mais isolado dentre os FFND, o que também ocorreu nas unhas das mãos. Guilhermetti *et al.* (2007) relataram, em Maringá, uma incidência de *Fusarium* spp. em 7,5% dos 360 casos de onicomicoses; sendo o grupo de FFND o mais isolado e também prevalente nas unhas dos pés de mulheres; relacionando-se ao uso freqüente de calçados abertos, com risco de lesões e maior contato com o solo.

Já em homens, prevaleceram os dermatófitos nas unhas das mãos e dos pés, sendo *T.rubrum* a espécie mais isolada, apontada como a mais freqüente nas dermatofitoses ungueais em Goiânia e em Porto Alegre (Costa *et al.*, 1999; Aquino *et al.*, 2007). Da mesma forma, no Rio de Janeiro, dentre os 400 casos de onicomicose, prevaleceram aquelas causados por dermatófitos, com predominância de *T.rubrum* em unhas de ambos os sexos e, entre os FFND, houve um caso de *Scytalidium dimidiatum* na unha

da mão e quatro nas unhas dos pés. *Fusarium* spp. foi isolado em 2 casos de unhas dos pés (Araujo *et al.*, 2003b).

Godoy-Martinez *et al* (2009), em São Paulo, verificaram que 42% de um total de 588 amostras de unhas foram positivas para onicomicose, mas FFND foi isolado apenas das unhas dos pés e na proporção de 7,4%. Não houve isolamento de *Scytalidium* spp.

No Ceará, as unhas das mãos foram majoritariamente infectadas por leveduras, seguidas de *T.rubrum*, enquanto que nas unhas dos pés houve predomínio de *Fusarium* spp. (Brilhante *et al.* , 2005).

Na cidade de Cali, Colômbia, as onicomicoses foram mais freqüentes nas unhas dos pés de mulheres. Os dermatófitos foram predominantes, destacando-se *T. rubrum* e, entre FFND, *Fusarium* spp. e *Scytalidium* spp. apresentaram prevalências de 6 e 5.3%, respectivamente (Alvarez *et al.* 2004).

Na Turquia, de 374 amostras positivas para onicomicoses, 33 foram de não-dermatófitos e 175, de dermatófitos. O grupo FFND foi isolado de unhas dos pés e de mulheres, com predomínio de *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp. Não houve registro de *Scytalidium* spp.(Hilmioglu-Polat *et al.*, 2005).

Na Tailândia, país de clima quente e úmido, os fungos filamentosos *Scytalidium dimidiatum* (34,8%) e *Fusarium* spp.(16,3%) foram os FFND prevalentes nas unhas dos pés, seguido dos dermatófitos, com prevalência de *T. rubrum* (Ungpakorn, 2005). Da mesma forma, em Teerã (cidade também de clima quente) FFND representaram 19% dos agentes causadores, com *Fusarium* spp. correspondendo a 5% deles e nenhum isolamento de *Scytalidium* spp. (Hashemi *et al.*, 2009).

Na Grécia, o fungo mais freqüentemente isolado de onicomicoses foi *Candida* spp. seguido de dermatófitos e FFND (9,4%), dentre os quais nenhuma espécie de *Scytalidium* spp. ou *Fusarium* spp. foi isolada (Ioannidou *et al.*, 2006).

No Reino Unido, Midgley *et al.* (1997) reportaram que nas onicomicoses, unhas dos pés foi o sítio mais acometido com predomínio de 73% de *T. rubrum* e 6% de FFND, estando entre os isolados: *Scytalidium* spp., *Scopurariopsis brevicaulis*, *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. e *Acremonium* spp.

Na Estônia, o grupo fúngico predominante nas unhas dos pés foi o dos dermatófitos e o fungo mais isolado foi *T.rubrum* (Järv *et al.*, 2004). Enquanto na Turquia, *T. rubrum* teve apenas 7% de prevalência entre os dermatófitos causadores de *Tinea unguium*, sendo que as espécies *T.interdigitale* e *T. verrucosum* foram as prevalentes (Kazemi 2007).

Em relação aos testes de suscetibilidade *in vitro*, as faixas de variação das CIMs obtidas mostraram que dermatófitos (*Trichophyton*) foram mais inibidos que FFND e, que entre estes, *Fusarium* foi menos inibido que *Scytaalidium*, ficando este, em posição de suscetibilidade intermediária entre os três gêneros de fungos citados, resultados observados também para os valores de CIM50 e CIM90.

Araujo Mota *et al.* (2009) encontraram resultados mais elevados de CIM 90 para itraconazol, cetoconazol e terbinafina na inibição de *T.rubrum*; em contrapartida, Sarifakioglu *et al.* (2007) demonstraram valores menores que os nossos, sendo o CIM90 de 0.008 para terbinafina e 0.06 para itraconazol.

Os FFNDs *Fusarium* spp. e *Scytaalidium* spp. apresentaram CIMs mais elevadas quando comparadas com as do dermatófito. Os isolados de *Scytaalidium* spp mostraram-se mais suscetíveis aos antifúngicos em relação à *Fusarium* spp. É possível que esse perfil de suscetibilidade reflita na prevalência dos fungos, havendo predominância de *Fusarium* spp. devido à sua maior resistência ao tratamento; além disso, as lesões por *Scytaalidium* spp., por serem muito semelhantes às causadas por dermatófitos, talvez recebam tratamento eficaz (com terbinafina) mesmo sem o diagnóstico micológico laboratorial.

Para esses fungos, Ghannoum *et al.* (2000) encontraram que as CIMs para *Fusarium* spp. variaram de 4 – 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  em itraconazol e de 0.5 a 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  em terbinafina. Para *Scytaalidium* spp. variaram de 1 a 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  em itraconazol e de 0.03 a 0.06  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  em terbinafina. Os nossos resultados demonstraram CIMs mais elevadas frente a terbinafina e menores em relação ao itraconazol. Essas variações podem se dever a diferenças na metodologia utilizada no teste, ao critério de leitura e ao número de amostras.

Spader *et al.* (2009) encontraram, para *Fusarium* spp. (todos isolados de infecções invasivas) CIMs que variaram de 2–16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para cetoconazol; >16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para

itraconazol e 2- 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para terbinafina. Thompson *et al.* (2010) encontraram em sua revisão uma variação de 4 - >16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de itraconazol frente a *Fusarium* spp., valor que, talvez, teríamos encontrado caso essas concentrações tivessem sido utilizadas no nosso trabalho, já que muitos isolados não foram inibidos pela maior concentração utilizada. Azor *et al.* (2009) testaram alguns antifúngicos contra espécies de interesse clínico de *Fusarium* spp. as CIMs variaram de 1 – 32 para cetoconazol, 0.06 – 32 para terbinafina e para todos os isolados a CIM de itraconazol correspondeu a 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Diante de grande variação entre os resultados encontrados em testes de suscetibilidade para *Fusarium* spp. e nas respostas aos tratamentos, não há terapia padronizada para o tratamento de onicomicose por tal fungo. Alguns autores relatam sucesso no tratamento tópico aliado a remoção ungueal, outros, no tratamento sistêmico com itraconazol ou terbinafina (Hattori *et al.*, 2005). Tosti *et al.* (2000) relataram a ineficácia de itraconazol e terbinafina contra *Fusarium*, no entanto, obtiveram bons resultados no tratamento tópico com ciclopirox olamina 8% em esmalte e terbinafina tópica.

No nosso estudo não foi possível identificar diferença de resposta às drogas entre as espécies de *Fusarium* testadas (*F. solani* e *F. oxysporum*), devido ao reduzido número de isolados de *F. oxysporum* testados. Ambas, de modo geral, não responderam à ação dos antifúngicos, com exceção de alguns isolados que responderam à terbinafina e ao efeito combinado de terbinafina e ciclopirox. Alastruey-Izquierdo *et al.* (2008) observaram variação de CIMs entre espécies de *Fusarium* e recomendam os testes de suscetibilidade para escolha do tratamento.

Lacroix *et al.* (2008) relataram que para *Scytalidium* spp. as CIMs frente ao itraconazol variaram de 0.03 a >16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (CIM90 >16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e de 0.06 a 2 (CIM90=1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para terbinafina. Demonstrando valores maiores que os nossos para itraconazol e menores para terbinafina.

A identificação dos agentes de onicomicoses é importante e de acordo com os resultados *in vitro* deste e de outros estudos pode determinar o sucesso do tratamento. A Tabela 12 apresenta comparações entre as variações de CIMs obtidas neste estudo e por outros autores, através do método de microdiluição em caldo. É importante

considerar que as diferenças dos CIMs pode se dever às diferenças na execução do teste, como inóculo, temperatura e tempo de incubação

Tabela 13: Variações de CIMs ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) de antifúngicos testados frente a três gêneros de fungos filamentosos

Fungos	Autores	Drogas antifúngicas			
		Terbinafina	Itraconazol	Cetoconazol	Ciclopirox
<i>T. rubrum</i>	Thompson <i>et al.</i> (2010)	0.002 – 16	0.25 – 0.5		
	Mota <i>et al.</i> (2009)	0.03 – 0.5	0.03 - 4	0.03 - 4	
	Sarifakioglu <i>et al.</i> (2007)	$\leq 0.008-0.015$	0.008– 0.12		
	Pujol <i>et al.</i> (2002)		$\leq 0.01-1$	0.5 - 2	
	Serrano-Martino <i>et al.</i> (2003)	$\leq 0.03$	0.06 – 2		
	Santos <i>et al.</i> (2005)	$< 0.03$	$< 0.03 - 1$	0.06 - 2	
	Schaller <i>et al.</i> (2009)				8 - 16
	Santos <i>et al.</i> (2006)	$<0.03$	0.03 – 0.5	0.06 - 4	0.03 - 1
	Gupta <i>et al.</i> (2003)	0.003-1	0.06-32	0.06- 8	0.015-0.125
	<b>Nossos resultados</b>	<b>0.06-0.125</b>	<b>0.007–0.06</b>	<b>0.003–0.06</b>	<b>0.06 - 2</b>
<i>Scytalidium</i> spp.	Ghannoum <i>et al.</i> (2000)	0.03-0.06	1-4		
	Gupta <i>et al.</i> (2003)	0.125-0.25			0.125-2
	Lacroix <i>et al.</i> (2008)	0.06-2	0.03 - >16		
	<b>Nossos resultados</b>	<b>0.5 - 16</b>	<b>1 – 4</b>	<b>1 – 2</b>	<b>0.5 – 2</b>
<i>Fusarium</i> spp.	Ghannoum <i>et al.</i> (2000)	0.5-16	4-8		
	Gupta <i>et al.</i> (2003)	0.125			8
	Spader <i>et al.</i> (2009)	2-16	>16	2-16	
	Thompson <i>et al.</i> (2010)		4 - >16		
	Azor <i>et al.</i> (2009)	0.06 – 32	32	1 – 32	
	Kuzucu <i>et al.</i> (2004)		16		
	<b>Nossos resultados</b>	<b>2 - &gt;32</b>	<b>4 - &gt;4</b>	<b>2 - &gt;2</b>	<b>2 - &gt;2</b>

Os tratamentos de onicomicose se dão de forma oral e/ou tópica, dependendo do grau de acometimento da unha. Os resultados de interação entre antifúngicos na inibição dos fungos filamentosos demonstraram que o tratamento combinado pode ser mais eficaz não só pelas diferentes vias de administração das drogas, mas também pelo efeito que exercem.

De todas os isolados submetidos ao teste de microdiluição combinado, aqueles que apresentaram maior tendência para sinergismo foram os de *Scytalidium* spp., que só não sofreram efeito sinérgico para a interação entre itraconazol e cetoconazol, a qual, aliás, apresentou interação indiferente para todos os isolados testados.

Terbinafina, além de ter apresentado os melhores resultados quando testada isoladamente, ainda demonstrou bons resultados em combinação, onde a interação terbinafina com itraconazol ou cetoconazol demonstrou maior índice de sinergismo entre as drogas testadas.

As diversas combinações testadas não apresentaram resultados significativos quando testadas com *Fusarium* spp. e *Trichophyton* spp.. Enquanto o primeiro demonstrou CIMs elevadas, não demonstrando resposta às concentrações testadas, o dermatófito apresentou CIMs baixas, não sofrendo influencia pela combinação das drogas.

Santos *et al.* (2006) utilizando os mesmos parâmetros adotados no presente estudo relataram que as combinações entre ciclopirox olamina e itraconazol e ciclopirox olamina e cetoconazol revelaram efeito sinérgico sobre todos os isolados testados de *T. rubrum* e *T. interdigitale*.

Gupta *et al.* (2003b) consideraram parâmetros de interação diferentes dos nossos, onde os valores de FCI  $\leq 0.5$  foram interpretados como interação sinérgica e FCI  $>0.5$  e  $\leq 1$  como efeito aditivo de drogas. Em testes de combinação de ciclopirox olamina com terbinafina e de ciclopirox olamina com itraconazol houveram sinergismos em dois entre os cinco isolados de *Scytalidium dimidiatum* e em um entre sete isolados de *Fusarium* spp.

Obtivemos resultados relativos à redução das CIMs, que segundo o critério utilizado por Gupta *et al.* (2003b), podem ser considerados como efeito aditivo; demonstrando, que no caso de resposta *in vivo*, correspondente à resposta *in vitro*, o uso combinado de medicamentos pode facilitar o tratamento, necessitando de menor dosagem e até mesmo reduzindo o tempo de tratamento.

Nossos resultados demonstram bons resultados na combinação de cetoconazol e terbinafina. No entanto, tal azólico apresenta alta hepatotoxicidade, assim apontamos como melhor opção as combinações envolvendo terbinafina, itraconazol e ciclopirox olamina.

## 7 CONCLUSÃO

- 1) As onicomicoses foram as dermatomicoses mais prevalentes em nosso estudo.
- 2) Os grupos de fungos mais freqüentes na etiologia das onicomicoses foram, em ordem decrescente: leveduras, fungos filamentosos dermatófitos e filamentosos não-dermatófitos.
- 3) Dentre os fungos filamentosos agentes de onicomicoses, os dermatófitos foram predominantes, com maior prevalência do gênero *Trichophyton*, com a espécie *T. rubrum*.
- 4) Em geral, os gêneros de fungos filamentosos mais predominantes na etiologia das onicomicoses foram *Trichophyton spp* (21,7%), *Fusarium spp.* (11,2%) e *Scytalidium spp.*(8,4%).
- 5) As unhas das mãos foram mais acometidas por leveduras e as unhas dos pés, por fungos filamentosos.
- 6) Nas unhas dos pés do sexo feminino o fungo filamentoso mais prevalente foi *Fusarium spp.* enquanto que no sexo masculino, foi *T. rubrum*.
- 7) Os testes de suscetibilidade *in vitro* mostraram que isolados de dermatófitos foram mais sensíveis que isolados do grupo não-dermatófitos.
- 8) Entre os não-dermatófitos, *Fusarium spp.* foi menos inibido que *Scytalidium spp.*, que por sua vez, foi menos inibido que o dermatófito *Trichophyton spp.*
- 9) Dentre as combinações testadas, não houve nenhum efeito antagônico e, com exceção daquela entre itraconazol e cetoconazol, as demais apresentaram efeito sinérgico sobre algum isolado. Os melhores resultados foram apresentados pelas combinações envolvendo itraconazol e terbinafina.
- 10)A combinação entre drogas apresentou maiores índices de sinergismo para o gênero *Scytalidium spp.* O melhor resultado para este gênero foi também obtido pela combinação itraconazol e terbinafina.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aghamirian MR, Ghiasian SA. Onychomycosis in Iran: Epidemiology. Causative agents and clinical features. *Jpn. J. Med. Mycol.* 2010; 51: 23 – 29.

Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Monzón A, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL. Antifungal susceptibility profile of clinical *Fusarium* spp. isolates identified by molecular methods. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2008; 61: 805 – 809.

Albert SF, Weis ZH. Management of onychomycosis with topicals. *Clin Podiatr Med Surg.* 2004; 21: 605 – 615

Alvarez MI, González LA, Castro LA. Onychomycosis in Cali, Colombia. *Mycopathologia* 2004; 158: 181 – 186.

Alvarez P, Enríquez AM, Toro C, Martínez I, Buhigas I, De Miguel S, Lago M, Puente S, Del PaLacio A, Baquero M. Dermatomicosis de importación por *Scytalidium dimidiatum*: a propósito de três casos. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17: 102-106.

Aquino VR, Constante CC, Bakos L. Freqüência das dermatofitoses em exames micológicos em Hospital Geral de Porto Alegre, Brasil. *An Bras Dermatol*, 2007; 82 (3):239 – 244.

Araújo AJG, Bastos OMP, Souza MAJS, Oliveira JC. Ocorrência de onicomiose em pacientes atendidos em consultórios dermatológicos da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. *An bras Dermatol* 2003a; 78(3): 299-308.

Araújo AJG, Bastos OMP, Souza MAJS, Oliveira JC. Onicomioses por fungos emergentes: análise clínica, diagnóstico laboratorial e revisão. *An. Bras. Dermatol* 2003b; 78 (4): 445 – 455.

Aspiroz C, Gené J, Rezusta A, Charles L, Summerbell RC. First Spanish case of onychomycosis caused by *Chaetomium globosum*. *Medical Mycology* 2007; 45: 279 – 282.

Azor M, Gené J, Cano J, Manikandan P, Venkatapathy N, Guarro J. Less-Frequent *Fusarium* species of clinical interest: correlation between morphological and molecular

identification and antifungal susceptibility. *Journal of Clinical Microbiology* 2009; 47 (5): 1463 – 1468.

Ballesté R, Mousqués N, Gezuele E. Onicomycosis. Revisión del tema. *Rev Med Uruguay* 2003; 19: 93 – 106.)

Baran R, Kaoukhov A. Topical antifungal drugs for the treatment of onychomycosis: an overview of current strategies for monotherapy and combination therapy. *JEADV* 2005; 19: 21 – 29.

Baran R, Sigurgeirsson B, de Berker D, Kaufmann R, Lecha M, Faergemann J, Kerrouche N, Sidou F. A multicentre, randomized, controlled study of the efficacy, safety and cost-effectiveness of a combination therapy with amorolfine nail lacquer and oral terbinafine compared with oral terbinafine alone for the treatment of onychomycosis with matrix involvement. *British Journal of Dermatology* 2007; 157: 149 – 157.

Bassiri-Jahromi S, Khaksar AA. Nondermatophytic moulds as a causative agent of onychomycosis in Tehran. *Indian J Dermatol.* 2010; 55 (2): 140-143.

Brash J. Pathogenesis of tinea. *JDDG* 2010; 8: 1 – 7.

Brilhante RSN, Cordeiro RA, Medrano DJA et al. Onychomycosis in Ceará (Northeast Brazil): epidemiological and laboratory aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2005; 100 (2): 131 – 135)

Bueno JG, Martinez C, Zapata B, Sanclemente G, Gallego M, Mesa AC. In vitro activity of fluconazole, itraconazole, voriconazole and terbinafine against fungi causing onychomycosis. *Clinical and Experimental Dermatology*, 2009; 35: 658 – 663.

Campanha AM, Tasca RS, Svidzinski TIE. Dermatomicoses: Freqüência, Diagnóstico Laboratorial e Adesão de Pacientes ao Tratamento em um Sistema Público de Saúde, Maringá-PR, Brasil. *Lat. Am. J. Pharm.*, 2007; 26 (3): 442-8.

Cantón E, Pemán J, Romero M, Gobernado M. Utilidad Del E-test<sup>®</sup> y SUS condiciones de ensayo em El estudio de La interacción de los antifúngicos. Estudio piloto. *Rev Esp Quimioterap* 2004; 17 (1): 48 – 56.

Carazo JLS, Losada LO, Sanjuan VP. Tratamiento actual de las micosis superficiales. *Rev Iberoam Micol* 1999; 16: 26-30

Castro López N, Casas C, Sopo L, Rojas A, Del Portillo P, Cepero de García MC, Restrepo S. *Fusarium* species detected in onychomycosis in Colombia. *Mycoses* 2008; 52:350 – 356.

Cavallera E, Asbati M. Onicomycosis por hongos filamentosos no dermatofitos. *Dermatología Venezolana* 2006; 44 (1): 4 – 10.

Chadeganipour M, Nilipour S, Ahmadi G. Study of onychomycosis in Isfahan, Iran. *Mycoses*. 2009; 53, 153 – 157.

Chen SCA, Sorrel TC. New drugs, old drugs. Antifungal agents. *MJA* 2007; 187 (7): 404 – 409.

Costa TR, Costa MR, Da Silva MV et al. Etiologia e epidemiologia das dermatofitoses em Goiânia, GO, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 1999; 32(4):367-371.

Damázio PMRBC, Lacerda HR, Filho AML, Magalhães OMC, Neves RP. Epidemiologia, etiologia e formas clínicas das dermatofitoses em Pernambuco, 1995 – 2005. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2007; 40 (4): 484 – 486.

De Araujo GML, De Araujo ND, De Farias RP, Cavalcanti FCN, Lima MLF, Braz RAF. Micosis superficiais na Paraíba: análise comparativa e revisão literária. *An Bras Dermatol*. 2010;85(6):943-6.

De Magalhães Lima K, Machado Barbosa de Castro CM, Fonsêca Nogueira Cambuim II, Carvalhaes de Oliveira J, Delgado M, Sette de Melo Rego R. Non-dermatophytic moulds: onychomycosis in four patients infected with the human immunodeficiency virus. *Rev Iberoam Micol*. 2008 Mar; 25 (1):45 – 49.

Elewski B, Tavakkol A. Safety and tolerability of oral antifungal agents in the treatment of fungal nail disease: a proven reality. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 2005; 1 (4): 299 – 306.)

Elewski BE. Onychomycosis: Pathogenesis, Diagnosis and Management. *Clinical Microbiology Reviews* 1998; 11 (3): 415 – 429.

Elkeeb R, Alikhan A, Elkeeb L, Hui X, Maibach HI. Transugueal drug delivery: Current status. *International Journal of Pharmaceutics* 2010; 384: 1- 8.

Escobar ML, Carmona-Fonseca J. Onicomiosis por hongos ambientales no dermatofiticos. *Rev Iberoam Micol*, 2003; 20: 6 – 10.

Evans EGV. Drug synergies and the potential for combination therapy in onychomycosis. *British Journal of Dermatology*. 2003; 149 (65): 11 – 1

Finch JJ, Warshaw EM. Toenail onychomycosis: current and future treatment options. *Dermatologic Therapy*. 2007; 20: 31 – 46.)

Ghannoum MA, Hajjeh RA, Scher R et al. A large-scale North American study of fungal isolates from nails: the frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns. *J Am Acad Dermatol* 2000; 43: 641–648.

Gianni C, Cerri A, Crosti C. Non-dermatophytic onychomycosis. An underestimated entity? A study of 51 cases. *Mycoses* 2000; 43: 29 – 33.

Godoy-Martinez P, Nunes FG, Silva V, Tomimori-Yamashita J, Zaror L, Fischman O. Onychomycosis caused by *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* in São Paulo, Brazil. *Mycopathologia* 2004; 157: 287 – 290.

Godoy-Martinez P, Nunes FG, Tomimori-Yamashita J, Urrutia M, Zaror L, Silva V, Fischman O. Onychomycosis in São Paulo, Brazil. *Mycopathologia* 2009; 168:111–116

Guilhermetti E, Takahachi G, Shinobu CS, Svidzinski TIE. *Fusarium* spp. as agents of onychomycosis in immunocompetent hosts. *International Journal of Dermatology*, 2007; 46: 822–826.

Gunt HB, Kasting GB. Effect of hydration on the permeation of ketoconazole through human nail plate in vitro. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2007; 32: 254 – 260.

Gupta AK, Cooper EA. Update in Antifungal Therapy of Dermatophytosis. *Mycopathologia* 2008; 166: 353 – 367.

Gupta AK, Kohli Y. In vitro susceptibility testing of ciclopirox, terbinafine, ketoconazole and itraconazole against dermatophytes and nondermatophytes, and in vitro evaluation of combination antifungal activity. *British Journal of Dermatology*, 2003b; 149: 296 – 305.

Gupta Ak, Tu LQ. Therapies for Onychomycosis: A Review. *Dermatol Clin* 2003a; 24: 375-379.

Gupta AK. Ciclopirox: an overview. *International Journal of Dermatology*. 2001; 40: 305 – 310.

Gupta AK, Jain HC, Lynde CW, Macdonald P, Cooper, E. A.; Summerbell RC. Prevalence and epidemiology of onychomycosis in patients visiting physicians' offices: a multicenter Canadian survey of 15000 patients. *J Am Acad Dermatol*. 2000; 43 (2): 244-248.;

Gupta AK, Ryder JE, Skinner AR. Treatment of Onychomycosis: Pros and Cons of antifungal agents. *J Cutan Med Surg*. 2004; 25 – 30.

Hashemi SJ, Gerami M, Zibafar E, Daei M, Moazeni M, Nasrollahi. Onychomycosis in Tehran: mycological study of 504 patients. *Mycoses* 2009; 53: 251 – 255.

Hattori N, Shirai A, Sugiura Y, Li W, Yokoyama K, Misawa Y, Okuzumi K, Tamaki K. Onychomycosis caused by *Fusarium proliferatum*. *British Journal of Dermatology*, 2005;153:647 – 649.

Hay RJ, Baran R. Onychomycosis: A proposed revision of the clinical classification. *Journal of the American Academy of Dermatology*, In Press, Corrected Proof, Available online 17 April 2011.

Hay RJ, Jones RM. New molecular tools in the diagnosis of superficial fungal infections. *Clinics in Dermatology* 2010; 28: 190–196

Hernández-Salazar A, Carbajal-Pruneda P, Martínez RF, Arenas R. Dermatofitosis por *Trichophyton rubrum*. Experiência de 10 años (1996-2005) en um servicio de

dermatologia de um hospital general de la Ciudad de México. *Rev Iberoam Micol.* 2007; 24: 122 – 124.

Hilmioglu-Polat, S.; METIN, D. Y.; INCI, R.; DERELI, T.; KILINÇ, I.; TÜMBAY, E. Non-dermatophytic molds as agents of onychomycosis in Izmir, Turkey – a prospective study. *Mycopathologia.* 2005; 160, 125 – 128.

Ioannidou DJ, Maraki S, Krasagakis SK, Tosca A, Tselentis Y. The epidemiology of onychomycosis in Crete, Greece, between 1992 and 2001. *JEADV* 2006; 20: 170 – 174.

Jain N, Sharma M, Saxena VN. Clinico-mycological profile of dermatophytosis in Jaipur, Rajasthan. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 2008; 74 (3): 274 – 275.

Järv H, Naaber P, Kaur S, Eisen M, Eisen M, Silm H. Toenail onychomycosis in Estonia. *Mycoses*, 2004; 47: 57 – 61.

Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH. Combination Antifungal Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004; 48 (3): 693 – 715.

Johnson MD, Perfect JR. Use of antifungal combination therapy: agents, order and timing. *Curr Fungal Infect Rep* 2010; 4 (2): 87 – 95.

Kaur R, Kashyap B, Bhalla P. Onychomycosis – Epidemiology, Diagnosis and Management. *Indian Journal of Medical Microbiology* 2008; 26 (2): 108 – 16.)

Kazemi A. Tinea unguium in the North-West of Iran (1996-2004). *Rev Iberoam Micol* 2007; 24: 113 – 117.

Kuzucu C, Rapino B, McDermott L, Hadley S. Comparison of the semisolid agar antifungal susceptibility test with the NCCLS M38-P Broth Microdilution Test for Screening of Filamentous Fungi. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004; 42 (3); 1224 – 1227.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. *Tratado de micologia médica.* 9ª edição. São Paulo: Sarvier, 2002

Lacroix C, Feuilhade de Chauvin M. In vitro activity of amphotericin B, itraconazole, voriconazole, posaconazole, caspofugin and terbinafine against *Scytalidium dimidiatum*

and *Scytalidium hyalinum* clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008; 61: 835 – 837.

Lacroix C, Kac G, Dubertret L, Morel P, Derouin F, Feuilhade de Chauvin M. Scytalidiosis in Paris, France. *J Am Acad Dermatol*, 2003; 48 (6): 852 – 856.

Llambrich A, Lecha M. Tratamiento actual de las onicomicosis. *Rev Iberoam Micol* 2002; 19: 127-129

López-Jodra O, Torres-Rodríguez JM. Especies fúngicas poco comunes responsables de onicomicosis. *Rev Iberoam Micol* 1999; 16: 11-15

Mahoney JM, Bennet J, Olsen B. The diagnosis of onychomycosis. *Dermatol Clin* 2003; 21: 463-467.

Martinez R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. *J Bras Pneumol*. 2006;32(5):449-60

Martinez-Rossi NM, Peres NTA, Rossi A. Antifungal resistance Mechanisms in Dermatophytes. *Mycopathologia* 2008; 166: 369 – 383.

Martins EA, Guerrer LV, Cunha KC, Soares MMCN, de Almeida MT. Onychomycosis: clinical, epidemiological and mycological study in the municipality of São José do Rio Preto. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2007; 40 (5): 596 – 598.)

Midgley G, Moore MK. Onychomycosis. *Rev Iberoam Micol* 1998; 15: 113 – 117.

Mota CRA, Miranda KC, Lemos JA, Costa CR et al. Comparison of in vitro activity of Five antifungal agents against dermatophytes, using the agar dilution and broth microdilution methods. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2009; 42 (3): 250 – 254.

Mügge C, Hausteil UF, Nenoff P. Causative agents of onychomycosis – a retrospective study. *JDDG*. 2006; 4, 218 – 228.

Nair AB, Kim HD, Chakraborty B, Singh J, Zaman M, Gupta A, Friden PM, Murthy SN. Ungual and trans-ungual iontophoretic delivery of terbinafine for the treatment of onychomycosis. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009; 98 (11): 4130 – 4140.

Nucci M, Anaissie E. Cutaneous infection by *Fusarium* species in healthy and immunocompromised hosts: implications for diagnosis and management. *Clinical Infectious Diseases* 2002; 35: 909 – 20.

Oliveira JAA, Barros JA, Cortez ACA, Oliveira JSRL. Superficial mycoses in the City of Manaus/AM between March and November/2003. *An Bras Dermatol.* 2006;81(3):238-43.

Palácio A, Garau M, Cuétara MS. Tratamiento actual de las dermatofitosis. *Ver Iberoam Micol* 2002; 19: 68 – 71.

Peres NTA, Maranhao FCA, Rossi A, Martinez-Rossi NM. Dermatofitos: interacao patogeno-hospedeiro e resistencia a antifungicos. *An Bras Dermatol.* 2010;85(5):657-67.

Peron MLDF, Teixeira JJV, Svidzinski TIE. Epidemiologia e etiologia das dermatomicoses superficiais e cutâneas na Região de Paranavaí – Paraná, Brasil. *RBAC*, 2005; 37 (2): 77 – 81.

Pincelli TPH, Brandt HRC, Motta AL, Maciel FVR, Criado PR. Fusariose em paciente imunocomprometido: sucesso terapeutico com voriconazol. *An Bras Dermatol.* 2008;83(4):331-4.

Pujol I, Capilla J, Fernández-Torres B, Ortoneda M, Guarro J. Use of the sensitre colorimetric microdilution panel for antifungal susceptibility testing of dermatophytes. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002; 40 (7): 2618 – 2621.

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

Richardson M, Edward M. Model systems for the study of dermatophytes and non-dermatophytes invasion of human keratin. *Revista Iberoamericana de Micologia* 2000; 17: 115 – 121.

Roberts DT, Evans EVG, Allen R. Fungal nail disease. London: Gower Medical; 1990. p.86

Romano C, Gianni C, Difonzo EM. Retrospective study of onychomycosis in Italy: 1985 – 2000. *Mycoses*. 2005; 48, 42 – 44.

Santos DA, Hamdan JS. In vitro antifungal oral drug and drug-combination activity against onychomycosis causative dermatophytes, *Medical Mycology* 2006; 44(4): 357 - 362

Santos DA, Hamdan JS. Evaluation of Broth Microdilution Antifungal Testing Conditions for *Trichophyton rubrum*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005; 43 (4): 1917 – 1920.

Sarifakioglu E, Seçkin D, Demirbilek M, Can F. In vitro antifungal susceptibility patterns of dermatophyte strains causing tinea unguium. *Clinical and Experimental Dermatology* 2007; 32: 675 – 679.

Sarma S, Capoor MR, Deb M, Ramesh V, Aggarwal P. Epidemiologic and clinicomycologic profile of onychomycosis from north India. *International Journal of Dermatology*, 2008; 47: 584 – 587.

Schaller M, Borelli C, Berger U, Walker B, Schmidt, Weindl G, Jäckel A. Susceptibility testing of amorolfine, bifonazole and ciclopiroxolamine against *Trichophyton rubrum* in an in vitro model of dermatophyte nail infection. *Medical Mycology* 2009; 47: 753 – 758.

Serrano-Martino MC, Chávez-Caballero M, Valverde-Conde A, Claro RM, Pemán J, Martín-Mazuelos E. Actividad in vitro de voriconazol y otros três antifúngicos frente a dermatofitos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21 (9): 484 – 487.

Shemer A, Nathansohn N, Trau H, Amichai B, Grunwald MH. Ciclopirox nail lacquer for the treatment of onychomycosis: An open non-comparative study. *Journal of Dermatology* 2010; 37: 137 – 139

Shivakumar HN, Vaka SRK, Sathesh Madhav NV, Chandra H, Narasimha Murthy S. Bilayered nail lacquer of terbinafine hydrochloride for treatment of onychomycosis. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2010; 99 (10):4267 – 4276.

Siqueira ER, Ferreira JC, Maffei CM, Candido RC. Occurrence of dermatophyte, in nails, feet and hands of university students. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006 May-Jun;39(3):269-71.

Spader TB, Venturini TP, Cavalheiro AS, Mahl CD, Mario DN, Lara VM, Santurio J, Alves SH. In vitro interactions between amphotericin B and other antifungal agents and rifampim against *Fusarium* spp. *Mycoses* 2009; 54: 131 – 136.

Surjusshe A, Kamath R, Oberai C, Saple D, Thakre M, Dharmshale S et al. Clinical and mycological study of onychomycosis in HIV infection. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2007; 73 (6): 397 – 401.

Thompson GR, Wiederhold NP. Isavuconazole: A Comprehensive Review of Spectrum of Activity of a New Triazole. *Mycopathologia* (2010) 170:291–313.

Torres-Rodríguez JM, Sellarte-Altisent M. Bilateral proximal cellulitis and onychomycosis in both big toes due to *Fusarium solani*. *Rev Iberoam Micol* 2006; 23: 241 – 244.

Torres-Rodríguez JM, Madrenys-Brunet N, Urrea-Arbeláez A, López-Jodra O. Terbinafina por vía oral en el tratamiento de la tinea unguium de los pies. Eficacia entre 12 y 24 semanas de tratamiento. *Rev Iberoam Micol* 1998; 15: 160-162.

Tortorano AM, Prigitano A, Dho G, Esposito MC, Gianni C, Grancini A, Ossi C, Viviani MA. Species distribution and in vitro antifungal susceptibility patterns of 75 clinical isolates of *Fusarium* spp. from Northern Italy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008; 52 (7): 2683 – 2685.

Tosti A, Piraccini BM, Lorenzi S. Onychomycosis caused by nondermatophytic molds: Clinical features and response to treatment of 59 cases. *J Am Acad Dermatol*. 2000; 42, 217 – 224.

Ungpakorn R. Mycoses in Thailand: Current Concerns. *Jpn J Med Mycol* 2005; 46: 81 – 86.

Vejnovic I, Huonder C, Betz G. Permeation studies of novel terbinafine formulations containing hydrophobins through human nails in vitro. *International Journal of Pharmaceutics* 2010; 397: 67 – 76.

Vélez A, Linares MJ, Fenández-Roldán JC, Casal M. Study of onychomycosis in Córdoba, Spain: Prevailing fungi and pattern of infection. *Mycopathologia* 1997; 137: 1 – 8.

Weitzman I, Summerbell RC. The Dermatophytes. *Clinical Microbiology Reviews* 1995; 8 (2): 240- 259.

Welsh O, Vera-Cabrera L, Welsh E. Onychomycosis. *Clinics in Dermatology* 2010; 28: 151 – 159.

Wille MP, Arantes TD, Monteiro da Silva JL. Epidemiologia das dermatomicoses em população da periferia de Araraquara –SP. *Rev Bras Clin Med*, 2009; 7: 295 – 298.

Xavier APM, Carvalhaes de Oliveira J, Ribeiro VLS, Souza MAJ. Epidemiological aspects of patients with ungual and cutaneous lesions caused by *Scytalidium* spp. *An Bras Dermatol*. 2010; 85 (6): 805 – 810.

Yarak S, Araújo TMA. Nail disorders in systemic disease: What the nail tell us. *RBM* 2009; 66: Edição Especial Dermatologia.

Zanardi D, Nunes DH, Pacheco AS, Tubone MQ, De Souza Filho JJ. Evaluation of the diagnostic methods of onychomycosis. *An. Bras. Dermatol* 2008; 83(2): 119 – 124.

## 9 ANEXOS

### 9.1 Meios de cultura utilizados

#### 9.1.1 Ágar Sabouraud dextrose

##### Composição

Peptona _____	10g
Dextrose _____	40g
Ágar _____	20g
Cloranfenicol _____	0,05g
Água destilada _____	1000mL

##### Modo de Preparo

- Pesagem do meio de acordo com as instruções do fabricante;
- Os constituintes são dissolvidos em água, fervidos para fundir o agar e distribuídos cerca de 7 mL em tubos com tampa rosqueável e esterilizados em autoclave;
- Após a esterilização os tubos são inclinados, no intuito de aumentar a superfície para crescimento fúngico, e após o meio adquirir consistência sólida é guardado em refrigerador.

#### 9.1.2 Ágar Mycosel® (Seletivo)

##### Composição

Peptona _____	10g
Glicose _____	10g
Cicloheximida _____	0,4g
Cloranfenicol _____	0,05g
Ágar _____	15,5g
Água destilada _____	1000mL

### Modo de Preparo

- Pesagem do meio de acordo com as instruções do fabricante;
- Os constituintes são dissolvidos em água, fervidos para fundir o agar e distribuídos cerca de 7 mL em tubos com tampa rosqueável e esterilizados em autoclave;
- Após a esterilização os tubos são inclinados, no intuito de aumentar a superfície para crescimento fúngico, e após o meio adquirir consistência sólida é guardado em refrigerador.

### 9.1.3 Ágar Batata dextrose

#### Composição

Batata _____	200g
Dextrose _____	15g
Ágar bacteriológico _____	15g
Cloranfenicol _____	0,1g
Água destilada _____	1000mL

#### Modo de Preparo

- Lavar bem as batatas inglesas e cortar em pedaços grandes com as cascas;
- Cozinhar as batatas em 500mL de água destilada em um béquer, por 8 a 10 minutos após o início da fervura, evitando a evaporação da água
- Filtrar todo líquido em gaze utilizando uma proveta de 500 mL e reconstituir o volume final para 500mL;
- Transferir o extrato de batata filtrado para um erlenmeyer, adicionar os demais constituintes do meio e completar o volume para 1000mL;
- Fundir o Agar por fervura
- Distribuir o meio em tubos com tampa rosqueável;
- Esterilizar em autoclave;
- Após a esterilização os tubos são inclinados, no intuito de aumentar a superfície para crescimento fúngico, e após o meio adquirir consistência sólida é guardado em refrigerador.

## 9.1.4 Meio utilizados em provas bioquímicas para identificação de dermatófitos

### 9.1.4.1 Identificação por requerimento nutricional de tiamina

#### Composição do meio

##### T1: Ágar base caseína

Caseína \_\_\_\_\_ 2,5g  
KHPO<sub>4</sub> \_\_\_\_\_ 1,8g  
MgSO<sub>4</sub> \_\_\_\_\_ 1,0g  
Glicose \_\_\_\_\_ 40,0g  
Ágar \_\_\_\_\_ 20,0g  
Água destilada \_\_\_\_\_ 1000mL

##### T4: Ágar base caseína com tiamina

Ágar base caseína \_\_\_\_\_ 100mL  
Solução de tiamina (10mg/10ml) \_\_\_\_\_ 2,0 mL

#### Descrição da técnica

Inóculos fúngicos de mesmo tamanho são transferidos para os tubos com ágar caseína sem e com tiamina (T1 e T4). Avaliar o crescimento nos tubos após cerca de 7 dias. Fungos que apresentam requerimento nutricional, apresentam crescimento bem mais evidente no tubo com tiamina.

### 9.1.4.2 Meio ágar Uréia (CHRISTENSEN)

#### Composição

Agar bacteriológico \_\_\_\_\_ 2 g  
Meio uréia \_\_\_\_\_ 3,9 g  
Água destilada \_\_\_\_\_ 100 mL

### **Preparo**

- Pesar 2 gramas de ágar e diluir em 100ml de água destilada;
- Esterilizar o meio em autoclave
- Pesar 3,9 g de meio uréia e homogeneizar no meio acima (fundido e resfriado a 55°C). Ferver rapidamente no forno de microondas ;
- Distribuir em tubos com tampa rosqueável, estéreis e inclinar (ângulo de 45°).

### **9.1.5 Meio RPMI 1640 (com glutamina e vermelho de fenol, sem bicarbonato de sódio) (Sigma-Aldrich)**

- Dissolver o conteúdo do pacote do meio desidratado em 900mL de água destilada, sob agitação com barra magnética, mas sem aquecimento;
- Adicionar glicose para concentração final de 2% (20g) e ajustar o pH para 7,0 com tampão MOPS (0,165 M);
- Completar o volume final para 1000mL e esterilizar o meio por filtração em filtro Millipore, membrana com diâmetro de poro de 0,22 mm;
- Retirar um pequeno volume para o teste de esterilidade;
- Conservar o meio em frasco estéril em geladeira.

### **9.2 Técnica do microcultivo em lâmina**

- Esterilizar placa de Petri contendo uma lâmina apoiada sobre um suporte;
- Em ambiente asséptico, transferir um bloco de ágar batata, distribuído em placa de Petri, de cerca de um centímetro quadrado para a lâmina sobre o suporte;
- Em seguida fazer um repique em cada lado do bloco de ágar a partir da colônia do fungo a ser identificado
- Cobrir com uma lamínula estéril o cubo de ágar batata fazendo uma pequena compressão para aderência da lamínula;
- Incubar em atmosfera úmida, a temperatura ambiente, colocando 1 mL de água destilada estéril dentro da placa com uma pipeta, tendo cuidado para não molhar a lâmina que contém o meio de cultura;

- Para observação microscópica, transfere-se, com uma pinça metálica, a lamínula que está cobrindo o cubo de ágar batata, para uma nova lâmina adicionada de uma gota de corante lactofenol azul de algodão;
- A observação é realizada em microscópio ótico com aumento de 400x.

### 9.3 Unha do pé com suspeita clínica de onicomicose. Confirmação por diagnóstico laboratorial de onicomicose causada por *Candida* spp.



### 9.4 Coleta de amostra para exame micológico



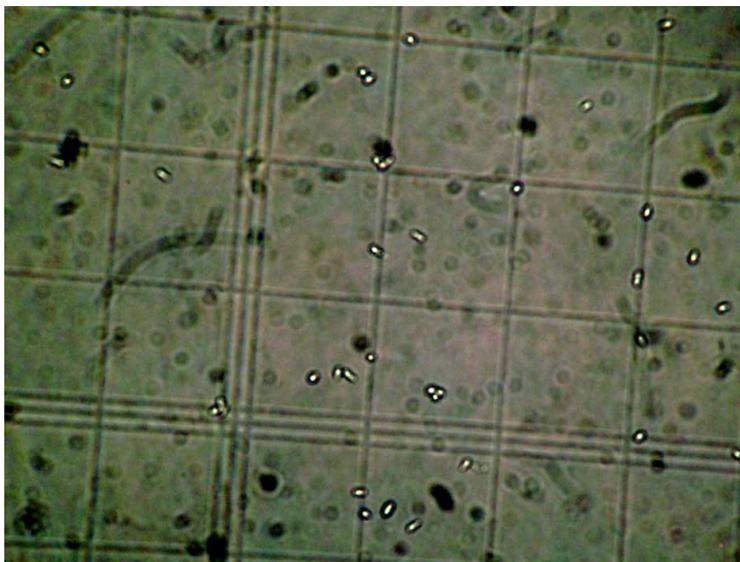
9.5 Unhas de idosos acometidas por *T.rubrum*, com presença de parasitismo bacteriano.



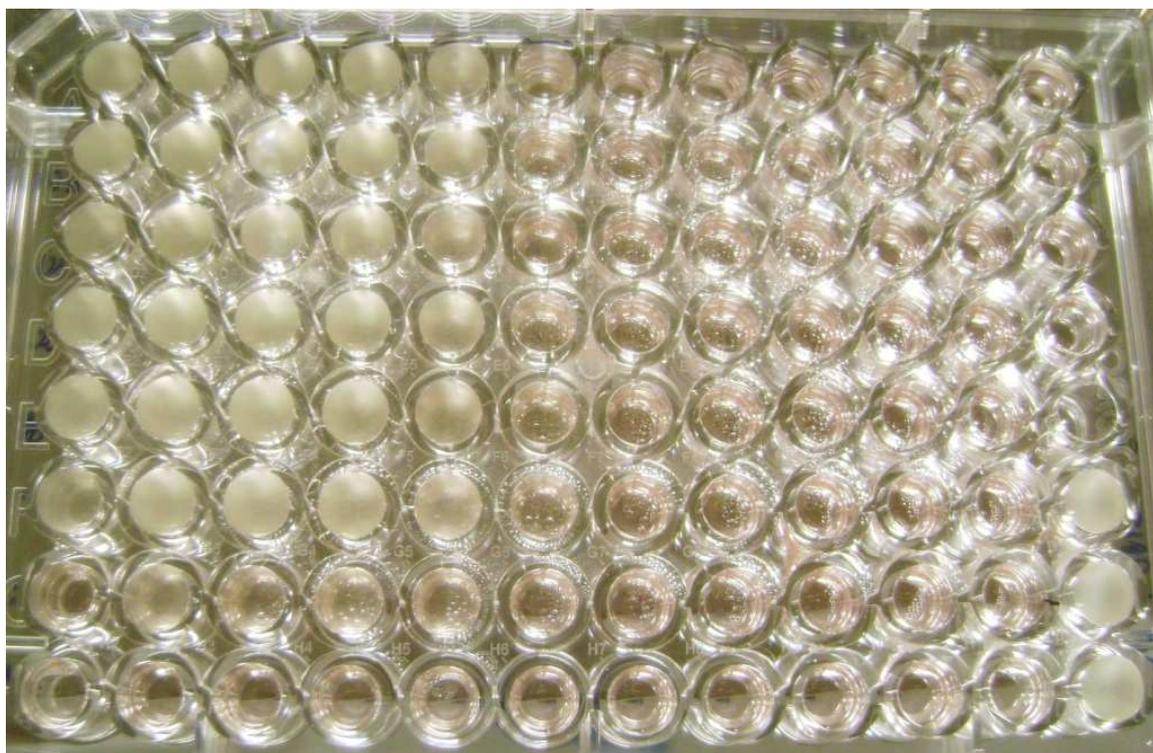
9.6 Contagem de conídios de *Fusarium* spp. em câmara de Neubauer



### 9.7 Contagem de conídios de *T. rubrum* em câmara de Newbauer



### 9.8 Placa de microdiluição representativa de interação indiferente de terbinafina e ciclopirox olamina



### 9.9 Placa de microdiluição representativa de interação sinérgica entre terbinafina e ciclopirox olamina

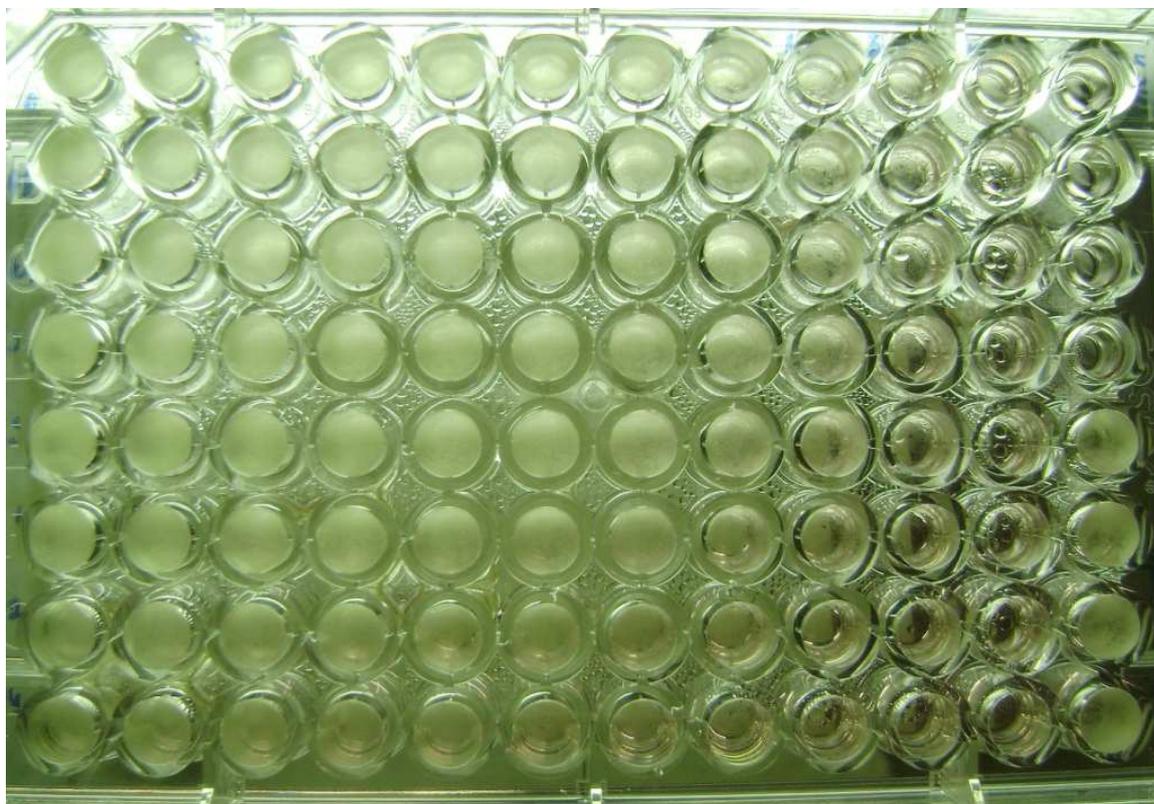


Tabela 1: resultados do exame microscópico direto e cultura de todas as amostras clínicas obtidas de pacientes com suspeita de onicomicose, no período de janeiro de 2009 a abril de 2011

Nº	NOME	SEXO	EXAME DIRETO	CULTURA	LOCAL DA LESÃO
12	E.P.O.	F	levedura	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
18	E.M.N.	F	levedura	<i>Candida spp.</i>	Unha do pé
20B	A.C.G.	F	levedura	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
35A	G.P.R	M	levedura	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
51	M.L.M.R.	F	levedura	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
52A	M.V.S.	F	leveduras	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
52B	M.V.S.	F	hifas	<i>Fusarium spp.</i>	Unha do pé
55	M.C.B.C.	F	hifas	<i>T.rubrum</i>	Unha do pé
85	A.S.S.	F	hifas	<i>T.rubrum</i>	Unha do pé
86A	Z.A.N.S.	F	pseudohifas	<i>Candida spp.</i>	Unha do pé
86B	Z.A.N.S.	F	pseudohifas	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
104	M.A.R.M.	F	hifas	<i>E.floccosum</i>	Unha do pé
110	A.S.C.	F	hifas	<i>Fusarium spp.</i>	Unha do pé

114	D.S.B.	F	hifas	<i>Fusarium spp.</i>	Unha do pé
128B	J.J.S.S.	M	hifas	<i>T.rubrum</i>	Unha do pé
142	M.V.R.	M	hifas	<i>Scytalidium spp.</i>	Unha da mão
159B	A.T.F.	M	hifas	<i>Aspergillus spp.</i>	Unha do pé
178	M.S.S.T.	F	hifas	<i>Scytalidium spp.</i>	Unha do pé
191A	M.G.C.A.	F	hifas	<i>M. canis</i>	Unha do pé
191B	M.G.C.A.	F	levedura	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
203	R.B.F.	M	hifas	<i>Trichosporon spp.</i>	Unha da mão
205B	J.P.S.	M	hifas artrosporadas	<i>T.rubrum</i>	Unha do pé
226A	D.R.T.	F	hifas	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
251B	F.L.T.	M	hifas	<i>T.rubrum</i>	Unha do pé
272	F.L.O.	M	negativo	<i>E.floccosum</i>	Unha do pé
284B	E.M.D.	F	leveduras	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
304B	E.V.	F	hifas	<i>T.rubrum</i>	Unha do pé
334B	C.E.S.	F	leveduras	<i>Candida spp.</i>	Unha do pé
345A	J.P.S.	F	leveduras	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
351A	L.R.B.	F	hifas e levedura	<i>Candida spp.</i>	Unha do pé
351B	L.R.B.	F	hifas	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
371A	C.A.N.	F	hifas	<i>Fusarium spp.</i>	Unha do pé
371B	C.A.N.	F	leveduras	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
390	J.E.S.	M	leveduras	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
409	C.M.	F	hifas	<i>Fusarium spp.</i>	Unha do pé
412	E.J.P.	F	hifas	<i>Fusarium spp.</i>	Unha do pé
423	M.G.O.B.	F	levedura e hifa	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
445	E.R.	F	hifas	<i>T.rubrum</i>	Unha do pé
466	N.A.F.	F	leveduras e pseudohifas	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
487A	M.P.C.P.	F	levedura	<i>Candida spp.</i>	Unha do pé
487B	M.P.C.P.	F	levedura	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
523A	M.G.F.	F	leveduras	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
564	F.F.	F	hifas	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
575	M.F.S.	F	levedura	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
586	S.F.L.	F	levedura	<i>Candida spp.</i>	Unha do pé
587	T.M.A.	F	levedura	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
588	M.F.A.	F	hifas	<i>T.rubrum</i>	Unha do pé
608A	G.S.A.	M	leveduras	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
608B	G.S.A.	M	hifas	<i>Fusarium spp.</i>	Unha do pé
610	D.P.A.	F	levedura	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
630	M.J.A.	M	hifas	<i>T.rubrum</i>	Unha do pé
631	M.M.	F	leveduras	<i>Candida spp.</i>	Unha do pé
644A	L.B.T.	M	hifas	<i>T.rubrum</i>	Unha do pé

644B	L.B.T.	M	levedura	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
651A	A.M.M.C.	F	hifas	<i>Scytalidium spp.</i>	Unha do pé
651B	A.M.M.C.	F	hifas	<i>Scytalidium spp.</i>	Unha da mão
710	M.A.P.	F	hifas	<i>T.interdigitale</i>	Unha do pé
722A	A.N.C.J.	M	leveduras	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
722B	A.N.C.J.	M	leveduras	<i>Candida spp.</i>	Unha do pé
727	Z.A.S.S.	F	hifas	<i>Candida spp.</i>	Unha do pé
728	A.R.P.	M	hifas	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
737B	D.B.	M	leveduras	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
737C	D.B.	M	hifas	<i>T.interdigitale</i>	Unha da mão
750	R.C.V.B.	F	levedura	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
751	D.O.V.	F	levedura	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
752	V.C.S.	F	hifas	<i>T.rubrum</i>	Unha do pé
763B	M.B.M.	F	leveduras	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
15	S.H.S.	F	hifas	<i>T.rubrum</i>	Unha da mão
16	L.M.G.	F	hifas	<i>T.rubrum</i>	Unha do pé
34	S..S.R.	M	hifas artroporadas	<i>T.rubrum</i>	Unha da mão
60A	S.W.	F	levedura	<i>Candida spp.</i>	Unha do pé
60B	S.W.	F	levadura	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
73	M.S.J.C.	F	hifas artrosporadas	<i>T.interdigitale</i>	Unha do pé
120B	M.F.R.	F	leveduras e pseudohifas	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
139B	E.F.P.	F	leveduras	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
161A	A.A.R.	F	leveduras	<i>Candida spp.</i>	Unha do pé
162	M.B.	F	leveduras	<i>Candida spp.</i>	Unha do pé
164A	R.G.A.	M	hifas hialinas	<i>Fusarium spp.</i>	Unha do pé
164B	R.G.A.	M	hifas demáceas	<i>Scytalidium spp.</i>	Unha do pé
177	C.R.	M	hifas hialinas e leveduras	<i>Candida spp.</i>	Unha do pé
188	C.A.S.	M	hifas	<i>Scytalidium spp.</i>	Unha do pé
189	M.J.A.R.	F	hifas artrosporadas	<i>Scytalidium spp.</i>	Unha do pé
202	V.R.	F	hifas	<i>Fusarium spp.</i>	Unha do pé
217	V.F.	F	pseudohifas	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
250A	M.B.	F	levadura	<i>Candida spp.</i>	Unha do pé
250B	M.B.	F	leveduras	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
251	Z.S.S.	M	levedura e pseudohifas	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
260	C.C.A.S.	F	hifas	<i>Scytalidium spp.</i>	Unha do pé
273	C.M.P.	F	negativo	<i>Candida spp.</i>	Unha do pé
287	B.S.A.	M	levedura e pseudohifas	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
291B	G.D.S.	F	pseudohifas	<i>Candida spp.</i>	Unha do pé
315A	M.N.R.	F	hifas	<i>Fusarium spp.</i>	Unha do pé
315B	M.N.R.	F	leveduras	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão

327	M.P.C.S.	F	levedura	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
328	D.C.O.	F	levedura e pseudohifas	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
329	J.P.S.	F	levedura	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
347	D.F.	F	hifas	<i>T.interdigitale</i>	Unha do pé
371	M.V.C.	F	levedura e pseudohifas	<i>Candida spp.</i>	Unha do pé
376	A.N.B.	F	hifas artrosporadas	<i>Scytalidium spp.</i>	Unha do pé
451A	A.G.S.	F	hifas artrosporadas	<i>T. intergitalis</i>	Unha do pé
452A	S.P.P.	F	hifas	<i>T.interdigitale</i>	Unha do pé
452B	S.P.P.	F	hifas	<i>T.interdigitale</i>	Unha da mão
542A	L.R.S.	F	negativo	<i>Fusarium spp.</i>	Unha do pé
542B	L.R.S.	F	negativo	<i>Fusarium spp.</i>	Unha da mão
578A	M.C.S	F	hifas	<i>T.rubrum</i>	Unha do pé
585B	N.C.S.	F	hifas	<i>T.rubrum</i>	Unha do pé
592	J.R.S.	M	hifas	<i>T.rubrum</i>	Unha do pé
595	L.H.J.S.	F	leveduras	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
615	J.S.A.	M	hifas	<i>Scytalidium spp.</i>	Unha do pé
628B	I.S.R.	F	hifas	<i>Scytalidium spp.</i>	Unha do pé
649	N.N.A.	F	hifas	<i>Scytalidium spp.</i>	Unha do pé
680	T.A.S.L.	F	hifas	<i>Fusarium spp.</i>	Unha do pé
689A	E.X.N.B.	F	hifas	<i>T. intergitale</i>	Unha do pé
689B	E.X.N.B.	F	leveduras	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
19B	S.T.S.C.	F	hifas	<i>T.rubrum</i>	Unha do pé
24A	E.T.R.	F	leveduras	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
24B	E.T.R.	F	hifas	<i>Fusarium spp.</i>	Unha da mão
26	M.R.B.	F	leveduras	<i>Candida spp.</i>	Unha do pé
32A	J.F.M.	M	hifas	<i>T.rubrum</i>	Unha da mão
52A	D.R.L.	F	hifas	<i>T. interdigitale</i>	Unha do pé
52B	D.R.L.	F	leveduras e pseudohifas	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
65	K.R.F.	F	hifas ou pseudohifas	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
70A	A.S.C.	F	leveduras e hifas	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
70B	A.S.C.	F	hifas	<i>T. interdigitale</i>	Unha do pé
83	A.S.P.	M	hifas	<i>T.interdigitale</i>	Unha do pé
90	R.M.N.	M	hifas	<i>T.rubrum</i>	Unha do pé
95A	S.T.S.C.	F	hifas e leveduras	<i>Candida spp.</i>	Unha do pé
95B	S.T.S.C.	F	leveduras	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
131	J.R.S.	M	hifas e leveduras	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
132B	V.S.S	F	levedura	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
134	G.M.G.	F	leveduras e pseudohifas	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
135	J.M.	F	leveduras	<i>Candida spp.</i>	Unha do pé
140	I.F.	F	leveduras	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão

145	D.P.F.	F	leveduras	<i>Candida spp.</i>	Unha do pé
155A	E.S.	F	leveduras	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
155B	E.S.	F	hifas	<i>Fusarium spp.</i>	Unha do pé
161A	A.M.L.	F	leveduras	<i>Candida spp.</i>	Unha do pé
161B	A.M.L.	F	leveduras	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
187A	R.C.D.L.	F	leveduras	<i>Candida spp.</i>	Unha da mão
187B	R.C.D.L.	F	hifas	<i>Aspergillus spp.</i>	Unha do pé
193	E.R.X.R.	F	hifas	<i>Fusarium spp.</i>	Unha do pé
195A	E.L.	M	hifas	<i>Aspergillus spp.</i>	Unha do pé
197	D.S.M.	F	leveduras	<i>Candida spp.</i>	Unha do pé

F: feminino / M: masculino

Tabela 2: Valores das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de Itraconazol (ITR), Terbinafina (TRB), Cetoconazol (CTZ) e Ciclopirox (CPX)

ISOLADOS	ITR	TRB	CTZ	CPX
1 <i>S. dimidiatum</i>	1	2	1	0.5
2 <i>S. dimidiatum</i>	2	16	2	2
3 <i>S. dimidiatum</i>	2	0.5	4	0.5
4 <i>S. dimidiatum</i>	2	8	4	2
5 <i>S. dimidiatum</i>	2	8	4	1
6 <i>S. dimidiatum</i>	2	1	2	1
7 <i>S. dimidiatum</i>	2	2	2	1
8 <i>S. dimidiatum</i>	2	0.5	2	1
9 <i>S. dimidiatum</i>	1	1	4	0.5
10 <i>S. dimidiatum</i>	2	1	4	0.5
11 <i>S. dimidiatum</i>	2	1	4	0.5
12 <i>S. dimidiatum</i>	2	1	4	1
13 <i>S. dimidiatum</i>	2	2	4	1
14 <i>S. dimidiatum</i>	>2	1	4	1
15 <i>S. dimidiatum</i>	2	1	4	1
1 <i>F. oxysporum</i>	2	16	4	2

---

2 <i>F.solani</i>	2	16	4	2
3 <i>F.solani</i>	2	32	4	2
4 <i>F.solani</i>	>2	16	>4	>2
5 <i>F. solani</i>	2	32	4	2
6 <i>F. solani</i>	2	2	4	2
7 <i>F. solani</i>	2	32	4	2
8 <i>F. oxysporum</i>	2	32	4	2
9 <i>F. solani</i>	2	32	4	2
10 <i>F. solani</i>	>2	2	>4	2
11 <i>F. solani</i>	>2	>32	>4	>2
12 <i>F. solani</i>	>2	32	>4	2
13 <i>F. solani</i>	>2	8	>4	>2
14 <i>F. solani</i>	>2	>32	>4	>2
15 <i>F. solani</i>	>2	>32	>4	>2
1 <i>T. rubrum</i>	0.06	0.06	0.03	0.5
2 <i>T. rubrum</i>	0.06	0.06	0.06	1
3 <i>T. rubrum</i>	0.06	0.06	0.06	1
4 <i>T. rubrum</i>	0.003	0.06	0.015	0.06
5 <i>T. rubrum</i>	0.015	0.06	0.015	1
6 <i>T. rubrum</i>	0.007	0.06	0.06	0.125
7 <i>T. rubrum</i>	0.25	0.06	0.125	0.5
8 <i>T. rubrum</i>	0.06	0.06	0.03	0.5
9 <i>T. rubrum</i>	0.015	0.06	0.03	0.125
10 <i>T. rubrum</i>	0.03	0.06	0.015	2
11 <i>T. rubrum</i>	0.06	0.125	0.125	0.125
12 <i>T. rubrum</i>	0.03	0.06	0.015	2
13 <i>T. rubrum</i>	0.06	0.06	0.06	0.5
14 <i>T. rubrum</i>	0.03	0.06	0.125	1
15 <i>T. rubrum</i>	0.03	0.06	0.06	0.5

---

