

Avaliação da susceptibilidade *in vitro* de fungos melanizados oriundos da carnaúba (*Copernicia prunifera*) ao fluconazol

Evaluation of the *in vitro* susceptibility of melanized fungi from carnauba (*Copernicia prunifera*) to fluconazole

Evaluación de la susceptibilidad *in vitro* de hongos melanizados de carnauba (*Copernicia prunifera*) al fluconazol

Recebido: 26/08/2025 | Revisado: 31/08/2025 | Aceitado: 31/08/2025 | Publicado: 31/08/2025

Igor dos Santos Cavalcante

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2907-9026>
Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Brasil
E-mail: igorsc@live.com

Luiz Henrique Lola Pereira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4256-6224>
Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Brasil
E-mail: luiz.lolapereira@yale.edu

Andressa Trindade da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3154-935X>
Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Brasil
E-mail: andressatrindade@ufpi.edu.br

Belize Rodrigues Leite

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9267-4904>
Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Brasil
E-mail: belize.leite@gmail.com

Tatiane Caroline Daboit

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5186-7382>
Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Brasil
E-mail: tatiane.daboit@ufdpar.edu.br

Resumo

Objetivo: Investigar a susceptibilidade *in vitro* de isolados fúngicos melanizados provenientes da carnaúba ao fluconazol. **Métodos:** Foram utilizadas técnicas de microdiluição em placas estéreis de 96 poços, padronizadas pelo documento M38-A3 do Clinical and Laboratory Standards Institute, a fim de determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) das amostras. Essa avaliação se faz necessária para determinar a menor concentração capaz de inibir o crescimento do fungo, verificando deste modo se o fungo é sensível ao fármaco testado. Avaliaram-se 7 isolados de fungos negros, sendo 5 provenientes do tronco e 2 a partir de folhas da carnaúba. Foram considerados sensíveis ao fluconazol quando a CIM foi $\leq 1 \mu\text{g/mL}$. **Resultados:** O fluconazol inibiu o crescimento de 4 fungos testados, apresentando CIM variável no intervalo de $1 \mu\text{g/mL}$ a $32 \mu\text{g/mL}$, embora apenas um deles foi sensível com CIM de $1 \mu\text{g/mL}$. **Conclusão:** Embora o fluconazol tenha inibido a maioria dos isolados testados (57,14%), apenas um mostrou-se sensível, enquanto que os outros 6 foram resistentes ao fármaco *in vitro*. Esse medicamento pode ser empregado no tratamento de infecções por fungos negros de forma pouco efetiva e não como tratamento de primeira linha, podendo ser utilizado em terapia combinada com outros antifúngicos. Destaca-se a importância da conscientização dos trabalhadores com a extração da Carnaúba, quanto ao uso de equipamentos de proteção individual, visto o risco de exposição a microrganismos resistentes a fármacos tais como o fluconazol, o que pode agravar o tratamento de infecções por fungos melanizados.

Palavras-chave: Microdiluição em Caldo; Fungos; Micoses; Farmacorresistência Fúngica.

Abstract

Objective: To investigate the *in vitro* susceptibility of melanized fungal isolates from carnauba to fluconazole. **Methods:** Microdilution techniques were used in sterile 96-well plates, standardized by document M38-A3 from the Clinical and Laboratory Standards Institute, in order to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the samples. This evaluation is necessary to determine the lowest concentration capable of inhibiting the growth of the fungus, thus verifying whether the fungus is sensitive to the drug tested. 7 isolates of black fungi were evaluated, 5

coming from the trunk and 2 from carnauba leaves. They were considered sensitive to fluconazole when the MIC was $\leq 1 \mu\text{g/mL}$. Results: Fluconazole inhibited the growth of 4 fungi tested, presenting a variable MIC in the range of $1 \mu\text{g/mL}$ to $32 \mu\text{g/mL}$, although only one of them was sensitive with an MIC of $1 \mu\text{g/mL}$. Conclusion: Although fluconazole inhibited the majority of tested isolates (57.14%), only one was sensitive, while the other 6 were resistant to the drug in vitro. This medication can be used in the treatment of black fungus infections in an ineffective way and not as a first-line treatment, and can be used in combination therapy with other antifungals. The importance of raising awareness among workers involved in Carnauba extraction is highlighted regarding the use of personal protective equipment, given the risk of exposure to microorganisms resistant to drugs such as fluconazole, which can worsen the treatment of melanized fungal infections.

Keywords: Broth Microdilution; Fungi; Mycoses; Fungal Pharmaco-resistance.

Resumen

Objetivo: Investigar la susceptibilidad in vitro de aislados fúngicos melanizados de palma carnauba al fluconazol. **Métodos:** Se utilizaron técnicas de microdilución en placas estériles de 96 pocillos, estandarizadas según el documento M38-A3 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLIN), para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las muestras. Esta evaluación es necesaria para determinar la concentración mínima capaz de inhibir el crecimiento fúngico, verificando así su sensibilidad al fármaco en estudio. Se evaluaron siete aislados de hongo negro: cinco del tronco y dos de hojas de palma carnauba. Se consideraron susceptibles al fluconazol cuando la CMI fue $\leq 1 \mu\text{g/mL}$. **Resultados:** El fluconazol inhibió el crecimiento de cuatro hongos analizados, con CMI de entre $1 \mu\text{g/mL}$ y $32 \mu\text{g/mL}$, aunque solo uno fue sensible a una CMI de $1 \mu\text{g/mL}$. **Conclusión:** Aunque el fluconazol inhibió la mayoría de los aislados analizados (57,14%), solo uno fue sensible, mientras que los otros seis fueron resistentes al fármaco in vitro. Este fármaco puede utilizarse en el tratamiento de infecciones por moho negro, pero no es eficaz ni se considera un tratamiento de primera línea. Puede utilizarse en terapia combinada con otros agentes antifúngicos. Es importante concienciar a los recolectores de carnauba sobre el uso de equipo de protección personal (EPP), dado el riesgo de exposición a microorganismos resistentes a fármacos como el fluconazol, lo que puede empeorar el tratamiento de las infecciones fúngicas melanizadas.

Palabras clave: Microdilución en Caldo; Hongos; Micosis; Resistencia Fúngica a Fármacos.

1. Introdução

Os fungos são microrganismos presentes em diversos ecossistemas e habitats, inclusive compoem parte da microbiota do corpo humano, o que pode torná-los potenciais fontes de infecções. Dentro desse contexto, os fungos melanizados, também ditos demáceos ou negros, possuem como peculiaridade uma pigmentação escurecida nos seus esporos, conídios e hifas, devido à produção acentuada de melanina, destacando-se principalmente por ser um fator de virulência e por conferir notável plasticidade biológica, que torna-os capazes de suportar condições extremas na natureza. Justamente por isso, mais de cem espécies e sessenta gêneros desses fungos estão associados a um amplo espectro de quadros infecciosos (Santos et al., 2020; Smith et al., 2024; Costa et al., 2020), dentre os quais merece especial atenção a cromoblastomicose, uma doença negligenciada de caráter crônico e ocupacional que afeta comumente trabalhadores rurais que realizam a atividade laboral sem proteção, deixando-os vulneráveis quanto a eventuais riscos biológicos no cotidiano da profissão (Milani et al., 2023).

Em países tropicais, como o Brasil, e em regiões com clima quente e úmido, a exemplo da planície litorânea piauiense, é bastante comum a ocorrência dessas infecções. Todavia, como não são doenças de notificação compulsória, torna-se bastante difícil o reconhecimento de seu impacto direto na população, sendo, portanto, um problema de saúde pública, pois revela a qualidade das políticas sanitárias brasileiras (Oedmann et al., 2024). Portanto, o conhecimento adequado acerca da susceptibilidade dos fungos negros presentes na natureza e especialmente em zonas de risco pode contribuir para a implementação de medidas de saúde que visem a melhoria da qualidade de vida e prevenção de agravos, de modo a evitar desfechos negativos e inoportunos através da elaboração de medidas efetivas de controle.

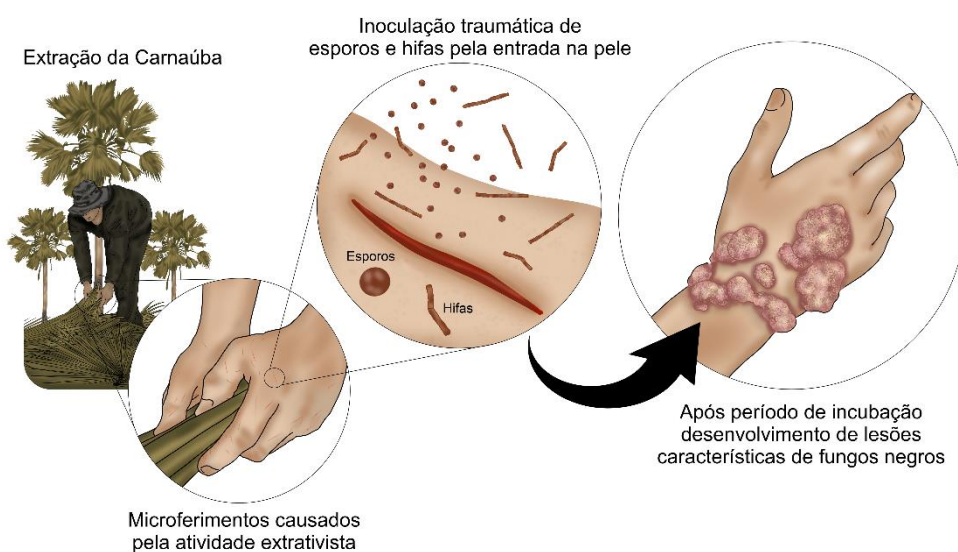
O fluconazol, um composto triazólico, o qual apresenta baixa atividade para linhagens ambientais de *Aureobasidium pullulans* e *Cladophialophora carrionii*, possui comportamento e eficácia variável em relação a diferentes cepas encontradas na natureza, já que os fungos negros podem apresentar-se de forma diversa no meio ambiente e assim a susceptibilidade

demonstra-se divergente de acordo com a espécie testada (Campos et al., 2020; Najafzadeh et al., 2014; Vitale et al., 2009). Até o presente momento, a melhor alternativa para conhecer o risco real de uma determinada fonte ambiental é avaliar individualmente fungos coletados *in loco* (Pereira et al., 2021), encontrados em folhas e no tronco de plantas, pois essa é a principal via de inoculação no qual o risco de exposição está inserido na zona rural da planície litorânea.

A *Copernicia prunifera*, nome científico da carnaúba, representa grande importância socio-econômica devido ao seu uso integral, no qual se aproveita as folhas, frutos, flores, caule e raiz na confecção de produtos industriais e artesanais e por isso as atividades de extrativismo relacionados a essa planta no litoral piauiense atuam como fontes de infecção natural para fungos negros (Figura 1), deixando os trabalhadores que atuam nessa atividade expostos a infecções fúngicas (Neto et al., 2019; Almeilda., 2021)

Nessa perspectiva, como a cromoblastomicose é uma doença com acentuada dificuldade terapêutica, devido a inexistência de um procedimento padrão ou medicamento efetivo a longo prazo (Daboit et al., 2014), é fundamental que novos testes farmacológicos sejam realizados, a fim de que sejam elucidados dados acerca das susceptibilidades dos fungos negros encontrados na carnaúba aos antimicóticos. Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o fluconazol quanto à sua atividade *in vitro* contra fungos melanizados oriundos de isolados da carnaúba.

Figura 1 - Formas de adquirir cromoblastomicose, doença causada por fungos melanizados.



Fonte: Cavalcante et al., (2025).

2. Metodologia

2.1 Coleta e processamento das amostras

Realizou-se uma pesquisa com análise *in vitro*, com parte de coleta em campo e, parte da investigação laboratorial de natureza qualitativa e quantitativa (Pereira et al., 2018).

Os isolados foram obtidos de 5 palmeiras adultas, localizadas em uma planície de inundação próxima à rodovia PI-116, no Litoral do Piauí (2°51'59"S, 41°46'51"O), sendo coletadas amostras provenientes do tronco, folhas verdes, folhas secas e espinhos.

Foram pesados 5,0 g das amostras de tronco, folhas verdes e folhas secas da carnaúba os quais foram macerados com o auxílio de almofariz e pistilo e foram misturadas em 25 mL de Tween 20 contendo 200 mg/L de cloranfenicol, e agitadas vigorosamente por 30 minutos em vórtex. Alíquotas de 0,1 mL do extrato obtido foram cultivados com o auxílio da alça de Drigalski em 3 placas de Petri com Ágar Sabouraud Dextrose, que ficaram armazenadas por até 15 dias, a 28°C. Além disso, foi feita a técnica de flotação de óleo, ou seja, o mesmo processo foi realizado com mais 5,0 g das amostras, sendo adicionados 2 mL de óleo vegetal ao Tween, de forma a tornar o microambiente artificial mais propício à separação através da flotação, dos fungos com características mais lipofílicas, tais como os fungos negros. Alíquotas de 0,1 mL das mesmas foram inoculadas em 3 placas de Mycosel, que foram incubadas à 28 °C por até 30 dias, para a observação do surgimento de colônias escuras. O projeto foi cadastrado no SisGen sob o número A22E225.

2.2 Isolamento e manutenção das culturas

Foram isoladas e purificadas colônias de coloração escura por meio do método de esgotamento em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud Dextrose, sendo esses cultivados a 25 °C por até 10 dias. Após tais processos, os fungos foram mantidos a temperatura ambiente em tubos contendo o mesmo meio de cultura.

Com o intuito de realizar uma comparação e o controle dos experimentos, também foram utilizados isolados clínicos caracterizados molecularmente e amostras da American Type Culture Collection (ATCC®). Todas as amostras utilizadas pertencem à coleção do GEAMICOL - UFDFPar. Os isolados foram reativados para os experimentos em placas contendo Ágar Batata Dextrose, e incubadas durante 7 a 10 dias, a 35 °C.

2.3 Teste de susceptibilidade

Avaliou-se 7 isolados de fungos negros, sendo 5 provenientes do tronco e 2 a partir de folhas da carnaúba. O ensaio de susceptibilidade in vitro foi realizado através da técnica de microdiluição em caldo (Figura 2), padronizada pelo documento M38-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute*. O ensaio foi realizado em placas estéreis de 96 poços com fundo em “U”. No primeiro poço, tem-se a concentração máxima do fármaco testado, a qual é diluída em razão dois até o poço dez, de modo a se obter dez concentrações distintas. Essa diluição se faz necessária para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), menor concentração capaz de inibir o crescimento do fungo, determinando-se deste modo se o fungo é sensível à substância testada.

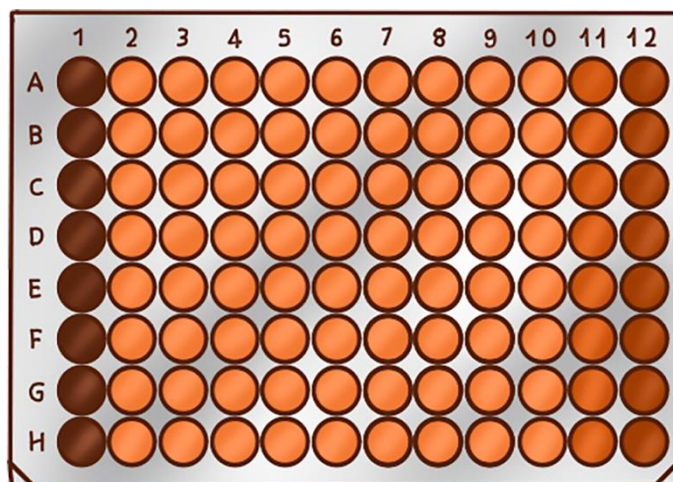
O antifúngico fluconazol (Sigma®, São Paulo, Brasil) foi diluído, primeiramente, em dimetilsulfóxido (DMSO, Vetec, São Paulo, Brasil) e, posteriormente, em meio sintético RPMI 1640 (MP Biomedicals, França) tamponado com ácido 3-(N-morfolino) propano sulfônico (MOPS, Neon, São Paulo, Brasil) a fim de se obter uma concentração final de 0,0313 a 64 µg/mL. A partir de culturas frescas, será preparada uma suspensão dos fungos com solução salina, a qual será ajustada em espectrofotômetro (QUIMIS, São Paulo, Brasil), à transmitância de 68-70%, $\lambda = 530$ nm.

Após esse processo de padronização, a suspensão foi diluída em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS em uma proporção de 1:50, para que a concentração final dos microrganismos seja de $0,4 \times 10^4$ a 5×10^4 UFCs/mL. Sendo assim, os poços de 2 a 12 foram preenchidos com 100 µL de meio RPMI 1640 tamponado com MOPS. À exceção dos poços 11 e 12, todos os outros poços devem conter o fármaco testado diluído em RPMI (100 µL) e o inóculo (100 µL). O poço 11 é considerado o controle de crescimento, por conter somente o meio RPMI com a suspensão de fungo (sem o fármaco). A cepa *Candida krusei* ATCC 6258 foi utilizada como controle de qualidade dos testes. No poço 12 tem-se o controle de esterilidade: uma vez que este apresenta apenas o meio RPMI (200 µL), é possível atestar a ausência de contaminantes. Os testes foram desenvolvidos em triplicata, a fim de garantir uma maior confiabilidade na leitura dos resultados. As placas foram incubadas por 7 a 10 dias, a 35

°C.

Os resultados da CIM foram determinados através da leitura visual das placas. O crescimento observado será comparado com os controles de crescimento e de esterilidade. Os resultados da triplicata do teste também serão comparados internamente. Os testes deverão ser repetidos em caso de discrepância entre os dados ou de discordância com o previsto pelo documento M38-A3.

Figura 2 - Esquema de Placa de 96 Poços para Teste de Susceptibilidade In Vitro pela Técnica de Microdiluição em Caldo.



- 100 μ L de Solução-mãe de fármaco + 100 μ L de inóculo padronizado
- 100 μ L de RPMI 1640 tamponado com MOPS com diluição do fármaco + 100 μ L de inóculo padronizado
- 100 μ L de RPMI 1640 com MOPS sem fármaco + 100 μ L de inóculo padronizado (Controle de crescimento)
- 200 μ L de RPMI (Controle de esterilidade)

Fonte: Cavalcante et al., (2025).

3. Resultados

Após a coleta, caracterização e o agrupamento dos fungos, foram contabilizados um total de 58 isolados provenientes da carnaúba, sendo destes 27 vindos do tronco, 21 de folha verde e 10 de folha seca. Autores como Marques et al. (2006) e Voidaleski et al. (2020), de forma análoga ao nosso estudo, conseguiram isolar fungos melanizados das cascas do coco babaçu (*Orbignya phalerata*). Adjacente a isso, observou-se relato de pacientes com lesões nas nádegas em pesquisa conduzida por Silva et al. (1995) com 30 indivíduos acometidos pela cromoblastomicose, devido à exposição de palmeiras durante processamento do coco babaçu, atividade extrativista comumente realizada no Maranhão, estado reconhecidamente endêmico dessa micose no Brasil.

Dos isolados inicialmente obtidos na natureza, apenas 5 (71,43%) advindos do tronco e 2 (28,57%) obtidos da folha verde da carnaúba estavam puros, de modo que a principal dificuldade encontrada na realização da pesquisa foi a contaminação ambiental que ocorreu em diversas amostras coletadas, dificultando sobremaneira o isolamento e uso dos fungos

negros nos testes de susceptibilidade. Por isso, o número de isolados nos testes foram reduzidos.

As CIM ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$ são geralmente utilizadas como um indicador de potencial susceptibilidade à maioria dos fármacos utilizados no tratamento de infecções por fungos demáceos, segundo Revankar e Sutton (2010).

A Tabela 1 apresenta as CIM dos isolados da carnaúba testados com fluconazol e a sua interpretação.

Observando os resultados, percebemos que o fluconazol inibiu o crescimento da maioria dos fungos testados (4), apresentando CIM variável no intervalo de 1 $\mu\text{g/mL}$ a 32 $\mu\text{g/mL}$, embora apenas um deles foi sensível com CIM de 1 $\mu\text{g/mL}$ (**MTR9**). Constatou-se ainda que três isolados (**MTR15**, **FV23** e **F34**) demonstraram CIM superior a 64 $\mu\text{g/mL}$, ou seja, a concentração máxima testada para o fluconazol, enquanto que outros três isolados (**MTR16**, **MTR8** e **MTR19**), foram inibidos, porém em doses altas (4 $\mu\text{g/mL}$, 16 $\mu\text{g/mL}$ e 32 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente).

Tabela 1 - Susceptibilidade *in vitro* dos isolados de fungos negros da carnaúba testados com o fluconazol.

| Isolados Fúngicos | Valores da CIM* para o fluconazol ($\mu\text{g/mL}$) | Interpretação |
|-------------------|--|-------------------|
| MTR8** | 16 | Resistente |
| MTR9 | 1 | Sensível |
| MTR15 | >64 | Resistente |
| MTR16 | 4 | Resistente |
| MTR19 | 32 | Resistente |
| FV23*** | >64 | Resistente |
| F34*** | >64 | Resistente |

Legenda: *CIM: Concentração Inibitória Mínima; **MTR: Isolado do Tronco da Carnaúba; ***FV e F: Isolados da Folha Verde da Carnaúba. Fonte: Cavalcante et al. (2025).

4. Discussão

Na literatura científica, com relação ao fluconazol, Vitale e colaboradores (2009) definiram o valor da CIM para cepas ambientais de *Cladophialophora carrionii* como sendo 4-16 $\mu\text{g/mL}$. Já para linhagens ambientais de *Aureobasidium pullulans*, estudadas por Najafzadeh et al. (2014), em que foi avaliada a sensibilidade *in vitro* de 104 isolados, encontrou-se como intervalo de CIM para o gênero 4 a > 64 $\mu\text{g/mL}$ e a média geométrica da CIM de 52,75 $\mu\text{g/mL}$ para o fluconazol, tornando sugestivo a resistência dos isolados a esse fármaco, o que corrobora com os achados do nosso estudo.

Badali et al. (2010), por sua vez, avaliaram 9 isolados de *Exophila jeanselmei* e 5 de *Exophila oligosperma* e obtiveram faixas de CIM para o fluconazol, respectivamente, 8-32 $\mu\text{g/mL}$ e 16-32 $\mu\text{g/mL}$, valores semelhantes ao observado na maioria dos fungos da carnaúba. Ferreira-Paim et al. (2012) isolaram 38 cepas de *Cryptococcus laurentii*, de árvores debris e fezes de pássaros nas redondezas de um hospital universitário, observando 71% dos isolados com baixa sensibilidade (16-32 $\mu\text{g/mL}$) para fluconazol, assim como obtido pelos isolados **MTR8** e **MTR19**, respectivamente.

Ainda, Coelho e colaboradores (2018) que verificaram o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos de isolados de *Fonsecaea* spp. obtidos de pacientes com cromoblastomicose, encontraram para o fluconazol a CIM mais elevada frente às espécies testadas, com uma faixa de 8-32 $\mu\text{g/mL}$, o que, segunda a autora, em consonância com outros estudos, demonstra que esse fármaco não é totalmente adequado para o tratamento da cromoblastomicose. Outrossim, em pesquisa realizada por Andrade (1999) na qual objetivou-se analisar a susceptibilidade de amostras de agentes comuns da cromoblastomicose, identificou-se resistência de todas as 39 cepas ao fluconazol, apresentando resultados compatíveis com 6 (85,7%) isolados desta pesquisa.

O tratamento da cromoblastomicose é bastante complexo, uma vez que não existe procedimento padrão ou medicamento específico (Daboit et al., 2014). O sucesso terapêutico pode estar relacionado ao agente etiológico e à gravidade da doença. Atualmente, o itraconazol e a terbinafina são os fármacos mais efetivos, usados continuamente ou em pulsoterapia, nas formas leve e moderada, com tendência à cura clínica no curso de tratamento a longo prazo. No entanto, as formas graves com lesões extensas respondem de forma insuficiente aos fármacos (Belda et al., 2022; Shenoy et al., 2023).

Em estudo de Mouchalouat (2008), que avaliou uma série de 14 casos de cromoblastomicose, foi utilizada terapia combinada de itraconazol com fluconazol em 5 pacientes (35,7%), a qual demonstrou eficácia nas formas moderada, grave e naqueles com história de tratamento prévio sem sucesso, com tempo de terapia entre 12 e 48 meses, o que demonstra que o fluconazol pode ser instituído como fármaco adjuvante no tratamento dessa doença, apresentando efeito sinérgico com o itraconazol.

Nessa perspectiva, observa-se que as concentrações inibitórias mínimas na maioria dos fungos da carnaúba testados apresentaram resultado semelhante ao encontrado em estudos que analisaram isolados ambientais e amostras clínicas. Assim, percebe-se que apenas 1 isolado foi sensível ao fluconazol e os outros 6 dos 7 fungos foram resistentes ao fármaco.

5. Conclusão

Por conseguinte, os resultados indicaram que, embora o fluconazol tenha inibido a maioria dos isolados testados, apenas 1 apresentou-se sensível, enquanto que os outros 6 foram resistentes ao fármaco quando avaliados *in vitro*, apresentando um amplo espectro da CIM entre 4-64 µg/mL.

O fluconazol não apresentou atividade satisfatória para a maioria dos isolados testados. Esse medicamento pode ser empregado no tratamento de infecções por fungos negros de forma pouco efetiva e não como tratamento de primeira linha, podendo ser utilizado em terapia combinada com outros antifúngicos, a exemplo do itraconazol, especialmente em casos de falha terapêutica ou recidiva em imunodeprimidos, o que corrobora com os resultados da literatura médica vigente. No entanto, o achado de resistência para a maior parte dos isolados da carnaúba testados aponta a importância da análise de susceptibilidade desses fungos antes de ser instituído um tratamento definitivo.

Além disso, é denotada a importância da conscientização das pessoas que trabalham com a extração da Carnaúba, quanto ao uso de equipamentos de proteção individual, visto o risco que elas podem estar expostas a microrganismos resistentes a fármacos tais como o fluconazol, o que pode agravar o tratamento de infecções por fungos melanizados.

Agradecimentos

Agradeço ao Grupo de Estudos Avançados em Micologia Médica (GEAMICOL) e à Universidade Federal do Delta do Parnaíba, pela condução deste estudo, fruto de experiências do Programa de Iniciação Científica, que levaram ao Trabalho de Conclusão de Curso em Medicina.

Referências

- Almeida, J. A. S., Feitosa, N. A., Sousa, L. C., Silva, R. N. O., Morais, R. F. & Monteiro, J. M. (2021). Use, perception, and local management of *Copernicia prunifera* (Miller) H. E. Moore in rural communities in the Brazilian Savanna. *J Ethnobiol and Ethnomed*, 17, 1. doi: 10.1186/s13002-021-00440-5.
- Andrade, T. S. (1999). Susceptibilidade *in vitro* de agentes causadores de cromoblastomicose frente a diferentes antifúngicos. f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós Graduação em Farmácia, Universidade de São Paulo. DOI: <https://doi.org/10.11606/D.9.2019.tde-14102019-114206>.
- Badali, H., Najafzadeh, M. J., Esbroeck, M. V., Enden, E. V. D., Tarazooie, B. & Meis, J. F. G. M. V. (2010). The clinical spectrum of *Exophiala jeanselmei*, with a case report and *in vitro* antifungal susceptibility of the species. *Med Mycol.*, 48(2), 318-327. doi: 10.1080/13693780903148353.

- Belda, W. J., Passero, L. F. D., Carvalho, C. H. C., Mojica P. C. R. & Vale, P. A. (2023). Chromoblastomycosis: New Perspective on Adjuvant Treatment with Acitretin. *Diseases*, 11(4), 162. doi: 10.3390/diseases11040162.
- Campos, T., Cosentino, C., Simioni, P. U. & Ugrinovich, L. (2020). Avaliação do Comportamento de Leveduras do gênero *Candida* a fármacos antifúngicos. *RCI*, 5:1. https://faculdadedeamericana.com.br/ojs/index.php/Ciencia_Inovacao/article/view/461.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. (2017). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. (3ed. CLSI standard M38. Wayne, PA: Clinica. <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m38/>.
- Coelho, R. A., Brito-Santos, F., Figueiredo-Carvalho, M. H. G., Silva, J. V. D. S., Gutierrez-Galhardo, M. C. & Valle, A. C. F. (2018). Molecular identification and antifungal susceptibility profiles of clinical strains *Fonsecaea* spp. Isolated from patients with chromoblastomycosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Plos Negl Trop Dis*. 212(7), e0006675. DOI: doi: 10.1371/journal.pntd.0006675.
- Costa, F. F., Silva, N. M., Voidaleski, M. F., Weiss, V. A., Moreno, L. F., & Schneider, G. X. (2020), Environmental prospecting of black yeast-like agents of human disease using culture-independent methodology. *Sci Rep.*, 10 (1), 1-1. doi: 10.1038/s41598-020-70915-0.
- Daboit, T. C., Magagnin, C. M., Heidrich, D., Antochewis, L.C, Vigolo, S. & Meirelles L. C. (2014). In vitro susceptibility of chromoblastomycosis agents to five antifungal drugs and to the combination of terbinafine and amphotericin B. *Mycoses*. 57(2), 116-20. doi: 10.1111/myc.12111.
- Ferreira-Paim, K., Andrade-Silva, L., Mora, D. J., Lages-Silva, L., Pedrosa, A. L., & Silva, P. R. (2012). Antifungal susceptibility, enzymatic activity, PCR-fingerprinting and ITS sequencing of environmental *Cryptococcus laurentii* isolates from Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Mycopathologia*, 174(1), 41-52. doi: 10.1007/s11046-011-9500-0.
- Marques, S. G., Silva C. M. P., Saldanha P. C., Rezende M. A., Vicente V. A. & Queiroz-Telles F. (2006) Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the shell of the babassu coconut (*Orbignya phalerata* Martius) in the Amazon region of Maranhão Brazil. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*, 47(4), 305-311. doi: 10.3314/jjmm.47.305.
- Milani, B., Dagne, D. A., Choi, H. L., Schito, M., Stone, H. A. (2023). Diagnostic capacities and treatment practices on implantation mycoses: Results from the 2022 WHO global online survey. *Plos Negl Trop Dis*, 17, 6. doi: 10.1371/journal.pntd.0011443.
- Mouchalouat, M. F. (2008). Cromoblastomicose estudo de uma série de 14 casos atendidos no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, de 1994 a 2005. 2008. f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro. <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/28073>.
- Najafzadeh, M. J., Sutton, D. A., Keisari, M. S., Zarrinfar, H., Hoog, G. S., & Chowdhary A. (2014). In vitro activities of eight antifungal drugs against 104 environmental and clinical isolates of *Aureobasidium pullulans*. *Antimicrob Agents and Chemother*, 58 (9), 5629-5631. doi: 10.1128/AAC.03095-14.
- Neto, F. R. G. X., Crispim, F. S. P., & Braga, P. E. T. (2019) Processos produtivos de trabalhadores rurais no extrativismo da palha de carnaúba. *Interações*, 20(40), 1263-1273. Doi: <https://doi.org/10.20435/inter.v20i4.1880>.
- Oedmann, A. F. B., Moraes, L. G. A., Freitas, M. C., Ferreira, B. A. S., & Mayer, N. (2024). Cromoblastomicose: estudo de 27 casos e revisão da literatura médica. *Arch Health, [S. l.]*, 5, 3, p. e2091. <https://doi.org/10.46919/archv5n3espec-404>.
- Pereira, G. B., Lizardo, C. A. R., Carvalho, L. C. S. & Souza, E. B. A. (2021). Ocorrência das infecções fúngicas subcutâneas em pacientes atendidos no laboratório de micologia médica do centro de pesquisa em medicina tropical. *Braz J Dev.*, 7 (12), 121016–121029. DOI:<https://doi.org/10.34117/bjdv7n12-732>
- Revankar, S.G., & Sutton, D.A. (2010). Melanized Fungi in Human Disease. *Clin Microbiol Rev.*, 23 (4), 884-928. doi: 10.1128/CMR.00019-10.
- Pereira, A. S. et al. (2018). Metodologia da pesquisa científica. [free ebook]. Santa Maria. Editora da UFSM.
- Santos, A. K. O., Ferreira, C., Quadros, R. M., Miletto, L. C., & Ramos, C. J. R. (2020). Fungos causadores de micoses cutâneas em trabalhadores rurais da região da AMURES, Santa Catarina, Brasil. *Rev Bras Hig Sanid Anim.*, 14, 4, 1-11. 1. <http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20200046>.
- Shenoy, M. M., Girisha, B. S. & Krishna S. (2023). Chromoblastomycosis: A Case Series and Literature Review. *Indian Dermatol Online J.*, 14(5), 665-669. doi: 10.4103/idoj.idoj_292_23.
- Silva, C. M., Rocha, R. M., Moreno, J. S., Branco, M. R., Silva, R. R., & Marques, S. G. (1995). O babaçu (*Orbignya phalerata* martins) como provável fator de risco de infecção humana pelo agente da cromoblastomicose no Estado do Maranhão, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop.*, 28(1), 49-52. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0037-86821995000100009>.
- Smith, D. J., Queiroz-Telles, F., Rabenja, F. R., Hay, R., Bonifaz, A. & Grijsen, M. L. (2024). A global chromoblastomycosis strategy and development of the global chromoblastomycosis working group. *Plos Negl Trop Dis*, 18, 10. doi: 10.1371/journal.pntd.0012562.
- Vitale, R. G., Perez-Blanco, M. & De Hoog, G. S. (2009). In vitro activity of antifungal drugs against *Cladophialophora* species associated with human chromoblastomycosis. *Med Mycol.*, 47 (1), 35-40. doi: 10.1080/13693780802566333.
- Voidaleski, M. F., Gomes, R. R., Azevedo, C. M. P., Lima B. F. S., Costa F. F. & Bombassaro A. (2020). Environmental Screening of *Fonsecaea* Agents of Chromoblastomycosis Using Rolling Circle Amplification. *J Fungi.*, 6(4):290. doi: 10.3390/jof6040290.