

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Jade André de Souza

**POTENCIAL ANTIBIOFILME FÚNGICO DA NITROXOLINA SOZINHA E EM
COMBINAÇÃO COM DIFERENTES ANTIFÚNGICOS**

Porto Alegre

2022

Jade André de Souza

**POTENCIAL ANTIBIOFILME FÚNGICO DA NITROXOLINA SOZINHA E EM
COMBINAÇÃO COM DIFERENTES ANTIFÚNGICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre(a) em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientador(a): Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Coorientador(a): Profa. Dra. Gabriella da Rosa Monte Machado

Porto Alegre

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Souza, Jade André de
POTENCIAL ANTIBIOFILME FÚNGICO DA NITROXOLINA
SOZINHA E EM COMBINAÇÃO COM DIFERENTES ANTIFÚNGICOS /
Jade André de Souza. -- 2022.
76 f.
Orientador: Alexandre Meneghello Fuentefria.

Coorientadora: Gabriella da Rosa Monte Machado.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Micologia Clínica. 2. Candida spp.. 3.
8-hidroxiquinolinas. 4. Biofilme Fúngico. I.
Fuentefria, Alexandre Meneghello, orient. II.
Machado, Gabriella da Rosa Monte, coorient. III.
Título.

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

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Fernando e Juliana, pelo apoio financeiro e emocional, por sempre me apoiarem nos meus sonhos e acreditarem no meu potencial;

Às minhas amigas, Luciana e Borges, por todo o apoio emocional e paciência, mesmo longe foram essenciais durante esse período;

Ao meu namorado, Rafael, que sempre me incentivou, me cobrou quando necessário e não me deixou desistir;

À minha família e amigos, que sempre me apoiaram mesmo que longe;

Ao Prof. Alexandre Fuentefria, por me dar uma oportunidade mesmo sem me conhecer, por ser extremamente compreensivo ao longo desses 2 anos e meio, me estimular e acreditar em mim. Muito obrigada pela orientação, sugestões e pelo conhecimento transmitido;

À Gabi, por aceitar me coorientar, me recepcionou e acolheu no laboratório, me ensinou e me auxiliou durante todo esse projeto;

À Paula, Roger, Lavínia, Tiago e Giovanna por tornar minhas manhãs melhores, pelas nossas risadas, almoços no RU, por todo o apoio, por sofrerem junto comigo e por me incentivarem a continuar sempre;

Aos demais colegas do grupo de pesquisa que me auxiliaram e transmitiram conhecimento ao longo desses anos;

Aos professores da banca, que aceitaram gentilmente participar e contribuir com este trabalho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, professores, secretaria e colegas;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa;

E a todos que contribuíram de alguma forma para este trabalho, meu muito obrigada!

POTENCIAL ANTIBIOFILME FÚNGICO DA NITROXOLINA SOZINHA E EM COMBINAÇÃO COM DIFERENTES ANTIFÚNGICOS

Autor: Jade André de Souza

Orientador(a): Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Coorientador(a): Profa. Dra. Gabriella da Rosa Monte Machado

RESUMO

Atualmente, as infecções fúngicas sistêmicas são uma das maiores problemáticas na saúde pública, uma vez que possuem altas taxas de mortalidade e uma terapia limitada. Predominantemente, essas infecções são causadas por fungos do gênero *Candida*, sendo a *Candida albicans* a espécie de maior incidência, porém espécies não-*albicans*, como *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* se tornaram emergentes. Devido ao aumento da seleção e desenvolvimento de isolados fúngicos resistentes, e da eficácia limitada dos antifúngicos disponíveis, faz-se necessário a prospecção por novas alternativas terapêuticas capazes de contornar essas problemáticas. Assim, uma das estratégias abordadas é o uso da terapia combinada, que permite a atuação em mais de um alvo celular, aumento da ação sinérgica, maior atividade de espectro e menor toxicidade. Além disso, o reposicionamento de fármacos também vem sendo utilizado no combate das infecções fúngicas resistentes e em casos de recidivas, sendo um processo de menor custo e menos dispendioso comparado ao desenvolvimento de um novo antifúngico. Derivados da 8-hidroxiquinolina, como a nitroxolina (5-nitro-8-hidroxiquinolina), vem apresentando um amplo espectro de atividades biológicas, como antibacteriana, antioxidante, antiviral, antiparasitária e antifúngica. Em vista disso, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar o potencial antibiofilme da nitroxolina sozinha e em associação, como uma nova alternativa ao combate de fungos leveduriformes de interesse clínico. O fármaco nitroxolina e três antifúngicos (anfotericina B, caspofungina e fluconazol) foram testados frente a biofilmes de *Candida* e *Trichosporon* em microplacas de poliestireno, de forma isolada e em combinação nas concentrações de CIM, CIMx2, CIMx10 e CIMx20 (NTX: 1-160 µg/mL; AMB: 0,25-40 µg/mL; CSP: 0,031-20 µg/mL; FLC: 0,25-2.560 µg/mL e NTX-AMB-CSP: 0,25-40, 0,031-20 e 0,015-10 µg/mL). A combinação tripla de nitroxolina, anfotericina B e caspofungina (NTX/AMB/CSP) apresentou-se como a melhor associação, pois apresentou ação sinérgica para a maioria das cepas testadas, e foi selecionada para os ensaios de biofilme. Caspofungina e fluconazol apresentaram maior inibição da formação do biofilme para a maioria das cepas testadas. Na remoção do biofilme pré-formado, o fluconazol e a anfotericina B apresentaram melhor desempenho entre os fármacos testados. Os fármacos nitroxolina, fluconazol e a combinação NTX/AMB/CSP foram os mais eficazes em reduzir a atividade metabólica das células do biofilme pré-formado. De forma geral o fluconazol apresentou o melhor desempenho frente a biofilmes, porém devido ao seu histórico de resistência, alternativas de tratamento são necessárias, a nitroxolina e sua combinação apresentaram um potencial antibiofilme promissor, e uma possível alternativa na inibição e remoção de biofilmes em dispositivos médicos.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (77 p.) dezembro, 2022.

FUNGAL ANTIBIOFILM POTENTIAL OF NITROXOLINE ALONE AND IN COMBINATION WITH DIFFERENT ANTIFUNGALS

Author: Jade André de Souza

Advisor: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Co-Advisor: Dra. Gabriella da Rosa Monte Machado

ABSTRACT

Nowadays, systemic fungal infections are one of the biggest problems in public health, once they have high rates of mortality and limited therapy. Predominantly, those infections are caused by fungi of the *Candida* genre, with the *Candida albicans* being the species of higher occurrence, but non-*albicans* species like *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* are becoming emerging species. Due to the increase of the selection and development of resistant isolated fungal, the prospect of new alternative treatments that are capable of overcoming those problems is necessary. Thus, one of the approaches is the use of combined therapy, that allows acting on more than one cellular target, increasing synergic action, higher activity and lesser toxicity. Also, the repositioning of medicines is being used on combat of resistant fungal infections and recurrences as well, being a cheaper process if compared to the development of a new antifungal. 8-hydroxyquinoline's derivatives like nitroxoline (5-nitro-8-hydroxyquinoline) are showing a wide range of biological activities, like antibacterial, antioxidant, antiviral, antiparasitic and antifungal. Therefore, the general goal of this work is to evaluate the antibiofilm potential of nitroxoline alone and in association as a new alternative to help fight against yeast-form fungi of clinical interest. The nitroxoline and three antifungals (amphotericin B, caspofungin and fluconazole) were tested isolated and combined in *Candida* and *Trichosporon* biofilms on polystyrene microplates at the concentrations of MIC, MICx2, MICx10 and MICx20 (NTX: 1-160 µg/mL; AMB: 0.25-40 µg/mL ; CSP:0.031-20 µg/mL; FLC: 0.25-2.560 µg/mL and NTX-AMB-CSP: 0.25-40, 0.031-20 and 0.015-10 µg/mL). The triple combination of nitroxoline, amphotericin B and caspofungin was chosen as the best association, since it had shown synergic action to the majority of the tested strains and it was selected to be tested on biofilms. Caspofungin and fluconazole reported greater inhibition of biofilm formation on the majority of the tested strains. At removal of the previously formed biofilm, fluconazole and amphotericin B reported better performance among the tested medicines. Nitroxoline, fluconazole and the NTX/AMB/CSP combination were the most effective in reducing the metabolic activities of the previously formed biofilm cells. Generally, fluconazole showed better performance against biofilms, but due to its background of resistance, alternative treatments are necessary. Also, nitroxoline and its combination showed a promising antibiofilm potential and a possible option in inhibiting and removing the biofilm on medical devices.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	2
2.1	Objetivo Geral	2
2.2	Objetivos Específicos	2
3.	REVISÃO DA LITERATURA	
3.1	Infecções fúngicas	3
3.1.1	Infecções por <i>Candida</i> spp.	5
3.1.1.1	<i>C. albicans</i>	5
3.1.1.2	<i>Candida</i> não- <i>albicans</i>	6
3.1.2	Infecções por <i>Trichosporon</i> spp.	8
3.2	Associação de COVID-19 com infecções fúngicas	8
3.3	Biofilmes fúngicos	10
3.4	Fármacos antifúngicos	12
3.4.1	Polienos	13
3.4.2	Azóis	13
3.4.3	Equinocandinas	14
3.4.4	Análogos de pirimidina	15
3.4.5	Alilaminas	15
3.4.6	Outros fármacos antifúngicos	15
3.5	Problemática e desafios da terapia antifúngica atual	16
3.6	Resistência fúngica	17
3.7	Perspectivas para superação dos desafios na terapia fúngica	19
3.7.1	Associação de fármacos	19
3.7.2	Reposicionamento de fármacos	21
3.8	Derivados da 8-hidroxiquinolina	22
3.9	Nitroxolina	24
4.	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1	Local de trabalho	26
4.2	Cepas fúngicas	26
4.3	Fármacos	27
4.4	Teste de suscetibilidade antifúngica (CIM)	27
4.5	Ensaio de sinergismo (<i>Checkerboard</i>)	28

4.6	Inibição da formação do biofilme (IFB)	29
4.7	Remoção do biofilme (RB)	30
4.8	Susceptibilidade do biofilme (CIMB)	31
4.9	Análise estatística dos dados	32
5.	RESULTADOS	32
6.	DISCUSSÃO	43
7.	CONCLUSÃO	49
8.	PERSPECTIVAS FUTURAS	50
9.	REFERÊNCIAS	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	35
Tabela 2	36
Tabela 3	37
Tabela 4	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processo de formação de biofilme entre as diferentes espécies de <i>Candida</i>	11
Figura 2. Estrutura química do núcleo quinolínico e da 8-hidroxiquinolina ...	23
Figura 3. Estrutura química do fármaco nitroxolina	26
Figura 4. Percentual de inibição da formação do biofilme dos fármacos sozinhos e em associação frente a diferentes isolados fúngicos... ..	40
Figura 5. Percentual de remoção do biofilme pré-formado dos fármacos sozinhos e em associação frente a diferentes isolados fúngicos... ..	41
Figura 6. Percentual de redução do metabolismo celular do biofilme dos fármacos sozinhos e em associação frente a diferentes isolados fúngicos.	42
Figura 7. Mecanismos de ação dos fármacos da combinação NTX-AMB-CSP.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	Absorbância
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AMB	Anfotericina B
ATCC	American Type Culture Collection
BrCAST	Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
CA	<i>Candida albicans</i>
CG	<i>Candida glabrata</i>
CH	<i>Candida haemulonii</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CIMB	Concentração Inibitória Mínima do Biofilme
CK	<i>Candida krusei</i>
CL	<i>Candida lusitanae</i>
COVID-19	<i>Coronavirus disease 19</i>
CP	<i>Candida parapsilosis</i>
CSP	Caspofungina
CT	<i>Candida tropicalis</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FLC	Fluconazol
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionária
IFB	Inibição da Formação do Biofilme
KOH	Hidróxido de Potássio
LPMA	Laboratório de Pesquisa em Micologia Aplicada
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i>
MOPS	Ácido morfolinopropanosulfônico

MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio
NTX	Nitroxolina
NTX-AMB	Nitroxolina e anfotericina B
NTX-AMB-CSP	Nitroxolina, anfotericina B e caspofungina
NTX-AMB-FLC	Nitroxolina, anfotericina B e fluconazol
NTX-CSP	Nitroxolina e caspofungina
NTX-CSP-FLC	Nitroxolina, caspofungina e fluconazol
NTX-FLC	Nitroxolina e fluconazol
RB	Remoção do Biofilme
RNA	Ácido ribonucleico

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, as infecções fúngicas sistêmicas são uma das maiores problemáticas na saúde pública, principalmente quando associadas com a formação de biofilme em implantes de dispositivos médicos. Apesar da predominância das infecções sistêmicas serem de origem bacteriana, o uso crescente de antimicrobianos de amplo espectro, de cateteres venosos centrais e outros dispositivos médicos, resultou no aumento da incidência das infecções causadas por fungos nos últimos anos. Durante a pandemia por SARS-CoV-2 (*Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*), houve o aumento de internações hospitalares, pacientes imunocomprometidos, intubações relacionadas à ventilação mecânica e necessidade de outros procedimentos e dispositivos invasivos. Como consequência, as infecções fúngicas oportunistas tornaram-se uma grande problemática, uma vez que estas possuem altas taxas de mortalidade e a terapia antifúngica é pouco eficaz e limitada. Predominantemente, essas infecções são causadas por fungos do gênero *Candida*, mas também podem ser causados por outras espécies leveduriformes e fungos filamentosos, como *Aspergillus*.

Dentre as infecções fúngicas, *Candida albicans* é a espécie de maior incidência em infecções sistêmicas no mundo. Porém, nos últimos anos, as espécies de *Candida* não-*albicans*, como *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* tornaram-se emergentes, sendo a formação de biofilme um importante fator de virulência e resistência fúngica, limitando ainda mais as opções de tratamento clínico. A capacidade de formação de biofilmes de *Candida* spp. pode variar entre as espécies. Segundo estudos atuais, *C. albicans* é a espécie com maior capacidade de formar biofilme, tanto em superfícies bióticas quanto abióticas, como dispositivos médicos.

Devido a problemática da presença de biofilme em implantes de dispositivos médicos e o alto risco de infecções sistêmicas, algumas medidas precisam ser implementadas para minimizar os riscos. A remoção do cateter e outros dispositivos médicos muitas vezes causam desconforto e risco a vida do paciente, portanto pode-se utilizar medidas profiláticas para tentar prevenir a perda do acesso, como a terapia de bloqueio, conhecida como “*antifungal catheter lock therapy*”, na qual o cateter, ou outro dispositivo médico, é exposto ao antifúngico por certo período de tempo, tentando minimizar os riscos de formação de biofilme e

consequente fungemia. Devido ao aumento da seleção e desenvolvimento de resistência fúngica e da eficácia limitada apresentada pelos antifúngicos disponíveis comercialmente, faz-se necessário estudos avaliando novas alternativas de combate ao crescimento fúngico e formação de biofilme.

Derivados da 8-hidroxiquinolina vêm apresentando um amplo espectro de atividades biológicas, como antibacteriana, antioxidante, antiviral, antiparasitária e antifúngica. Assim, o interesse nesse grupo de compostos vem aumentando muito nos últimos anos. A nitroxolina (5-nitro-8-hidroxiquinolina), fármaco derivado de 8-hidroxiquinolina, é utilizada desde a década de 1960 como um antibacteriano para o tratamento de infecções urinárias, tendo a capacidade de quelar cátions divalentes. A nitroxolina apresenta amplo espectro de ação, sendo ativa contra a maioria das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas uropatogênicas, apresentando também atividade antibiofilme frente às cepas de *Staphylococcus aureus* e *Acinetobacter baumannii* resistentes a medicamentos, na qual reduziu em 80% a síntese de biofilme formados por *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, a nitroxolina apresentou ação antifúngica frente ao gênero *Candida* (*C. albicans* e *Candida não-albicans*) em testes *in vitro*.

Portanto, diante da necessidade de novas alternativas ao combate a infecções causadas por biofilmes fúngicos, acredita-se que o reposicionamento da nitroxolina como um inibidor de formação de biofilme e a sua associação com outros antifúngicos (anfotericina B, caspofungina e fluconazol) possa ser promissor, sobretudo como uma alternativa imediata e segura na rotina de prevenção de infecção de pacientes que fazem uso de dispositivos como cateteres ou sondas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial antibiofilme da nitroxolina sozinha e em associação dupla e tripla (fluconazol, anfotericina B e caspofungina) frente a cepas leveduriformes de interesse clínico.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Avaliar o espectro de ação antifúngico da nitroxolina sobre cepas

de diferentes espécies de *Candida* e de *Trichosporon*, respectivamente: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. haemulonii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *Trichosporon asahii*;

2.2.2. Avaliar o possível efeito sinérgico *in vitro* das associações duplas e triplas frente a diferentes espécies de leveduras, com as combinações: NTX-AMB (nitroxolina e anfotericina B), NTX-CSP (nitroxolina e caspofungina), NTX-FLC (nitroxolina e fluconazol), NTX-AMB-CSP (nitroxolina, anfotericina B e caspofungina), NTX-AMB-FLC (nitroxolina, anfotericina B e fluconazol) e NTX-CSP-FLC (nitroxolina, caspofungina e fluconazol);

2.2.3. Determinar a atividade dos fármacos e da melhor associação sobre a inibição da formação, remoção e redução da atividade metabólica de biofilmes de leveduras em microplacas de poliestireno.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Infecções fúngicas

Os fungos são microrganismos eucarióticos que podem ser encontrados no ambiente e também na microbiota de animais, plantas e seres humanos. Apesar de nem todos serem patogênicos, alguns podem causar desde infecções leves a fatais, como as leveduras dos gêneros *Candida*, *Trichosporon* e *Cryptococcus* e os filamentosos, como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucorales* e dermatófitos (*Trichophyton*, *Epidermophyton* e *Microsporum*), sendo considerados uma preocupação na saúde pública mundial. Nas últimas décadas houve um aumento nos casos de infecções fúngicas, principalmente infecções nosocomiais em pacientes imunocomprometidos, com altas taxas de morbidade e mortalidade, sendo prevalente a infecção por leveduras do gênero *Candida* (Sydnor, Perl, 2011; CDC, 2014; Moubasher, Abdel-Sater, Soliman, 2017; Rocha, Azevedo, Chaves, 2017; Tsentemidou *et al.*, 2017; Rodrigues, Nosanchuk, 2020; Sharma, Nonzom, 2021). As infecções fúngicas podem ser classificadas em quatro grupos: superficiais, cutâneas, subcutâneas e sistêmicas. As infecções superficiais são as mais comuns, e ocorrem quando há a invasão do estrato córneo da pele, afeta milhões de indivíduos, principalmente em países com clima tropical e subtropical (Dismukes, Pappas, Sobel, 2003; Westerberg, Voyack 2014; Kim, 2016; Moubasher, Abdel-Sater, Soliman, 2017,

Mayser, Gräser, 2020). Essas infecções superficiais podem ser causadas por fungos como os dermatófitos, principalmente os gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, assim como leveduras do gênero *Candida*, *Malassezia*, *Trichosporon* (Ameen, 2010; Kaushik, Pujalte, Reese, 2015; Kim, 2016; Rocha, Azevedo, Chaves, 2017; Rocha *et al.*, 2018; Maranhão *et al.*, 2019).

Devido ao aumento dos números de pacientes imunocomprometidos, os quais apresentam uma maior suscetibilidade às infecções fúngicas, há um aumento do número de casos de infecções fúngicas invasivas, sendo uma grande problemática na saúde humana. Embora possam ocorrer com maior gravidade em pacientes imunossuprimidos, as infecções fúngicas também podem acometer pacientes imunocompetentes. Estima-se que cerca de 1.5 milhão de indivíduos morrem anualmente em decorrência de uma infecção fúngica, dentre os quais não receberam acesso à terapêutica adequada. Apesar de seu efeito desfavorável na saúde humana e considerada uma emergência médica, essas infecções continuam sendo negligenciadas, principalmente em países e populações de baixa renda, que muitas vezes não possuem acesso ao diagnóstico e tratamento adequado (Perlin, 2015; Bongomin, Gago, Oladele *et al.*, 2017; GAFFI, 2018; Rodrigues, Nosanchuk, 2020).

O diagnóstico precoce e correto de uma infecção fúngica é extremamente importante para o prognóstico do paciente. Os principais métodos de diagnóstico utilizados na rotina laboratorial para essas infecções é o Exame Direto - visualização da amostra clínica do paciente com solução de hidróxido de potássio (KOH) 20-40% em microscópio óptico, histopatologia e cultura de crescimento fúngico. Como métodos complementares podem ser utilizados testes sorológicos para detecção de antígenos fúngicos e também testes moleculares. Entretanto, observa-se algumas dificuldades relacionadas ao diagnóstico clínico, principalmente inerentes ao exame direto e à cultura fúngica, como coleta errônea da amostra, contaminação por outros microrganismos, falta de expertise dos profissionais microscopistas, demora e ausência de crescimento fúngico no cultivo da amostra. Tais adversidades decorrem em um diagnóstico tardio, que pode levar até um mês para liberação do laudo, contribuindo para as falhas terapêuticas, recidivas da infecção e limitação nos parâmetros dos testes de suscetibilidade antifúngica (Backx, White, Barnes, 2014; Rodrigues, Nosanchuk, 2020).

3.1.1 Infecções por *Candida* spp.

Apesar de fazerem parte da microbiota de humanos e animais, as leveduras do gênero *Candida* são oportunistas e também podem causar infecções de baixa a alta complexidade quando ocorre um desequilíbrio na microbiota desses hospedeiros (Rocha, Azevedo, Chaves, 2017; Sharma, Nonzom, 2021). Espécies de *Candida* podem causar desde infecções superficiais e mucosas, até infecções invasivas e disseminadas, com altas taxas de mortalidade. As leveduras do gênero *Candida* são responsáveis por causar cerca de setecentos mil casos anuais de candidíase invasiva e cerca de cinco espécies são responsáveis por 92% dos casos (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*), sendo *C. albicans* a principal espécie (Mora-Montes, Lopes-Bezerra, 2017; Rocha, Azevedo, Chaves, 2017; Sharma, Nonzom, 2021). A capacidade de escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro e a capacidade de formar biofilme são alguns dos principais fatores de virulência que regulam a patogenicidade dessas leveduras (Pappas *et al.*, 2016).

3.1.1.1. *C. albicans*

A *C. albicans* é uma levedura comensal que faz parte da microbiota humana. No entanto, quando há um desequilíbrio na homeostase no indivíduo, essa levedura torna-se um patógeno, podendo desenvolver um quadro infeccioso na pele, mucosa, e/ou disseminando-se por diferentes órgãos e pela corrente sanguínea do paciente. Essa espécie diferencia-se dos outros membros do gênero devido a presença de clamidósporos e pseudo-hifas, as quais estão expressas em processos patogênicos (Kaushik, Pujalte, Reese, 2015; Sachivkina, Podoprighora, Bokov, 2021). *C. albicans* é a mais prevalente do gênero, tanto em infecções superficiais quanto em invasivas. Além disso, também é a espécie com maior capacidade de formar biofilme. Biofilmes de *C. albicans* são comunidades microbianas estruturadas e compostas por duas camadas: uma camada basal, mais fina e formada por matriz extracelular com células leveduriformes, e uma camada mais espessa e compacta, com hifas e pseudo-hifas (Kim, 2016; Abdullah, Mushrif, Fahad, 2022). O principal alvo dos antifúngicos atuais é o ergosterol da membrana plasmática, inibindo sua biossíntese, como os azóis ou ligando-se a ele, como os polienos, levando a

formação de poros na membrana celular fúngica (Gonzalez et al., 2017). O antifúngico de primeira escolha na clínica médica é o fluconazol, devido ao seu amplo espectro de ação, baixo custo e baixa toxicidade ao paciente. Entretanto vem-se observando o surgimento de cepas de *Candida* com resistência adquirida ao fluconazol (Pai, Ganavalli, Kikkeri, 2018). A *C. albicans* pode adquirir resistência devido a mutações em genes, responsáveis por alterar o sítio de ligação do fármaco, aumentar a quantidade de enzimas alvos, diminuir subprodutos que podem ser tóxicos e/ou bombear o fármaco para fora da célula (Kim, 2016; Abdullah, Mushrif, Fahad, 2022).

3.1.1.2 *Candida* não-*albicans*

Candida glabrata, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* tornaram-se patógenos emergentes nas últimas décadas, apresentando distribuição variada conforme a região geográfica de cada continente. No Brasil e na América Latina predominam as espécies *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, enquanto no hemisfério norte, a predominância de *C. glabrata* é maior (Epelbaum, Chasan, 2017; Sharma, Nonzom, 2021). *C. glabrata* é o segundo patógeno mais comum nos casos de candidemia, apresentando altas taxas de mortalidade, cerca de 30-60%. Essa espécie possui resistência intrínseca aos fármacos azólicos, utilizados como primeira linha para o tratamento de candidíases, pois apresenta uma grande capacidade de adaptação frente a antifúngicos fungistáticos e a desenvolver mecanismos que favorecem a formação de biofilme. Tais características dificultam o tratamento de infecções causadas por *C. glabrata* (Deorukhkar, Saini, Mathew, 2014; Rodrigues, Duarte, Rosalem, 2014; Gabaldón; Gómez-Molero; Bader, 2019). Também foram relatados casos de falha terapêutica em tratamentos com equinocandinas em casos de candidemia por *C. glabrata*. Estudos em modelo animal sugerem que as equinocandinas possam ter efeito fungistático frente a *C. glabrata* (Nucci et al., 2013; Pristov; Ghannoum, 2019). O biofilme dessa espécie é compacto, possui metade da espessura de um biofilme de *C. albicans* e sua composição possui um alto teor de proteínas e carboidratos (Cavalheiro, Teixeira, 2018). *C. krusei* possui morfologia de blastoconídeos alongados e pseudo-hifas. Apesar de ser menos virulenta, e possuir uma adesão menor que *C. albicans*, é um importante patógeno do gênero, pois possui resistência intrínseca ao fluconazol, e

também pode apresentar uma diminuição da susceptibilidade frente à anfotericina B e flucitosina (Pfaller *et al.*, 2007; Whaley *et al.*, 2017, Pappas *et al.*, 2018). O complexo *C. parapsilosis* é formado por três espécies: *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis* (Neji *et al.*, 2017). Comumente isolada nas mãos de profissionais da saúde, a espécie é responsável por cerca de 15-30% dos casos de candidemia no Brasil. É uma espécie formadora de biofilme, e comumente afeta usuários de cateteres, recém-nascidos, prematuros e usuários de nutrição parenteral (Quindós, 2014; Pristov; Ghannoum, 2019). Seu biofilme é o mais compacto e fino entre todas as espécies de *Candida*, com uma matriz celular composta por carboidratos e baixo teor de proteínas, apresentando células leveduriformes e pseudo-hifas. Também apresentou cepas resistentes aos azóis, assim como outras espécies de *Candida* (Silva *et al.*, 2017; Pristov; Ghannoum, 2019).

C. tropicalis é frequentemente encontrada em pacientes internados em unidades de tratamento intensivo (UTI) e isolada em amostras de hemocultura e urocultura, sendo um emergente agente causador de candidemia hospitalar (Silva, *et al.*, 2012). Essa espécie também costuma ser suscetível aos antifúngicos disponíveis, porém algumas cepas apresentam perfil de resistência aos azóis. Em biofilmes, possui a segunda maior capacidade de adesão, atrás de *C. albicans*, sendo seu biofilme formado por uma matriz extracelular contendo baixo teor de proteínas e carboidratos, com uma rede de células leveduriformes, pseudohifas e hifas (Cavalheiro; Teixeira, 2018; Silva *et al.*, 2017). Outras espécies como *C. haemulonii* e *C. lusitaniae*, apesar de não serem isoladas com a mesma frequência que as demais espécies, observa-se o aumento de casos de infecções graves causadas por essas espécies. *C. haemulonii* pode apresentar multirresistência aos antifúngicos, assim como a *C. auris*, principalmente aos fármacos fluconazol e anfotericina B, com taxas de letalidade de 83,3%, sendo uma preocupação emergente. Os métodos de diagnóstico laboratorial convencionais podem identificar erroneamente cepas de *C. auris* com *C. haemulonii*, sendo recomendado métodos complementares para a confirmação da espécie. Há relatos de cepas resistentes à anfotericina B e com susceptibilidade reduzida frente aos azóis e equinocandinas (Lima *et al.*, 2020; Ramos *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2020; Pharkjaksu *et al.*, 2021). *C. lusitaniae* é um patógeno oportunista raro, que afeta principalmente indivíduos imunocomprometidos, como os pacientes com câncer e/ou em tratamento com

quimioterapia. Podem apresentar resistência à anfotericina B, flucitosina e fluconazol, sendo as equinocandinas o tratamento de primeira linha. *C. lusitaniae* possui uma alta capacidade de formação de biofilme (Salari *et al.*, 2018; Apsemidou *et al.*, 2020; Raja e Park, 2021; Mendoza, Gómez e Mora, 2022).

3.1.2 Infecções por *Trichosporon* spp.

O gênero *Trichosporon* faz parte da microbiota dos seres humanos, sendo as principais espécies *T. inkin*, *T. asahii* e *T. asteroides*. Atualmente vem apresentando relevância no contexto clínico, tornando-se leveduras oportunistas emergentes, provocando desde micoses superficiais a doenças invasivas, especialmente em pacientes imunocomprometidos, com taxas de mortalidade de cerca de 50-80% (Moubasher, Abdel-Sater, Soliman, 2017; Sharma, Nonzom, 2021). Dentre as espécies do gênero, *T. asahii* é agente mais comum em casos de tricosporonose invasiva. O diagnóstico e tratamento precoce são fundamentais para reduzir os riscos de vida ao paciente. Possui capacidade de formar biofilme, com células leveduriformes e filamentosas na matriz extracelular, sendo o biofilme um dos seus principais fatores de virulência. Apresenta resistência intrínseca às equinocandinas e pode apresentar suscetibilidade moderada para anfotericina B, fluconazol e itraconazol. O tratamento de escolha inicial é com o antifúngico voriconazol, além disso, a associação de equinocandinas com anfotericina B ou azóis pode apresentar efeitos antifúngicos sinérgicos (Bassetti *et al.*, 2004; Taj-Aldeen *et al.*, 2009; Mehta *et al.*, 2021),

3.2. Associação de COVID-19 com infecções fúngicas

No ano de 2020 iniciou-se a pandemia provocada pelo vírus SARS-CoV-2, causador da COVID-19 (*Coronavirus disease 19*). No Brasil, em dados relatados até novembro de 2022, houve quase setecentas mil mortes decorrentes da doença e/ou de suas sequelas (Ministério da Saúde, 2022). A COVID-19 pode causar desde sintomas leves, semelhantes a um resfriado, síndrome respiratória aguda grave e, até mesmo, o óbito, principalmente em pacientes portadores de comorbidades, como hipertensão, doenças renais, coronarianas, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e sobrepeso. Devido

ao aumento de casos de internações hospitalares, intubações e utilização de dispositivos médicos invasivos, como cateteres e sondas, o risco de uma co-infecção secundária, seja por bactéria, fungos ou parasitos, se tornou uma grande preocupação na área médica e na saúde pública (Janniger, Kapila, 2021; Erami *et al.*, 2022). Com isso, observou-se a associação de infecções por COVID-19 com infecções invasivas causadas por *Aspergillus* spp. e agentes da mucormicose em pacientes internados. Houve também o aumento de infecções causadas por *Candida* spp. nesses pacientes, sendo *C. albicans* e *C. parapsilosis* as espécies mais frequentes. Como escolha terapêutica, a equinocandina foi utilizada em 86% desses casos (Garnica *et al.*, 2022). Houve também um aumento na incidência de candidemias no período da pandemia, com aumento de infecções por *C. krusei* e *C. glabrata* (Moser *et al.*, 2021; Garnica *et al.*, 2022). As co-infecções entre COVID-19 e fungos, como *Aspergillus* sp. e *Candida* sp. resultaram em uma complexidade maior nos quadros clínicos e prognóstico dos pacientes. Nos casos de candidemia associada à COVID-19, a taxa de mortalidade é cerca de 83%, mesmo após administração da terapêutica antifúngica (Moser *et al.*, 2021; Erami *et al.*, 2022). Em 2021, a Índia apresentou cerca de quarenta e sete mil casos de mucormicose associados ao COVID-19, gerando uma preocupação mundial (Hoenigl *et al.*, 2022).

As co-infecções fúngicas são um dos vários fatores que contribuem para o aumento das taxas de mortalidade em pacientes COVID-19, especialmente nos casos mais graves. O uso de antibióticos, corticóides sistêmicos, anticorpos monoclonais anti-IL6 e outros medicamentos imunossupressores, cuja função é deter a “tempestade de citocinas” causada pelo vírus, podem potencializar os riscos de co-infecções nesses pacientes (Arastehfar *et al.*, 2020; Bhagali, Prabhudesai, Prabhudesai, 2021; Norberg *et al.*, 2021; Segrelles-Calvo *et al.*, 2021; Erami *et al.*, 2022). Em tratamentos de candidíase pulmonar associada à infecção por COVID-19, recomenda-se o uso de anfotericina B e caspofungina, as quais apresentam atividade superior frente às espécies de *Candida* (Erami *et al.*, 2022). O diagnóstico precoce e o tratamento adequado e imediato são essenciais para um prognóstico favorável ao paciente, entretanto, há diversas limitações principalmente em países de baixa renda (Arastehfar *et al.*, 2020; Janniger, Kapila, 2021; Erami *et al.*, 2022; Hoenigl *et al.*, 2022). A pandemia pelo vírus SARS-CoV-2 resultou num colapso mundial dos sistemas de saúde, e com isso houve um aumento exacerbado do uso

de antimicrobianos e outros medicamentos, mesmo sem a devida comprovação científica de sua eficácia frente ao vírus causador da COVID-19. No entanto, esse uso excessivo e muitas vezes sem necessidade, pode causar agravamento das infecções hospitalares, bem como a seleção e desenvolvimento de microrganismos resistentes aos antimicrobianos disponíveis (Segala *et al.* 2021; Wykowski, Fuentesfria, De Andrade, 2022).

3.3.1. Biofilmes fúngicos

Os biofilmes são comunidades microbianas aderidas a um substrato, biótico ou abiótico, e protegidas por uma matriz extracelular polimérica, composta por carboidratos, proteínas, glicose, fósforo, entre outros. É efetivo para a adaptação a condições de estresse, disponibilidade de nutrientes e cooperação metabólica, permitindo um aumento da resistência frente a antifúngicos, aumento da virulência e proteção contra mecanismos de defesa do hospedeiro. A formação de biofilme está relacionada com a dificuldade de tratamento e cronicidade das infecções (Mohandas, Ballal, 2011; Borghi, Borgo, Morace, 2016; Gupta, Daigle, Carviel, 2016; Souza *et al.*, 2020; Tirado-Sánchez, Bonifaz, 2020). Os biofilmes demonstram uma tolerância superior a antimicrobianos, variando de 50 a 1.000 vezes maior do que quando comparados a sua forma planctônica. O processo de formação de um biofilme fúngico (**Figura 1**) ocorre em quatro etapas: i) adesão das células leveduriformes sobre uma superfície formando uma camada basal do biofilme; ii) proliferação das células com o aparecimento de hifas e/ou pseudo-hifas, promovendo estabilidade; iii) maturação do biofilme, onde ocorre o espessamento da matriz extracelular e estruturação deste; iv) dispersão, quando há o desprendimento das células do biofilme para outros sítios, processo crítico no contexto das infecções sistêmicas por biofilme de espécies de *Candida* (Alim, Sircaik, Panwar, 2018; Wall *et al.*, 2019; Atriwal *et al.*, 2021).

A formação do biofilme por *Candida* spp. pode ser dividida em três fases: fase inicial (0-6h), fase intermediária (7-12h) e fase madura (13-48h) (Gu, Xu e Sun, 2015). Embora as espécies de *Candida* apresentem diferenças entre si na formação de seus biofilmes, e na expressão de resistência aos antifúngicos (Silva *et al.*, 2017; Cavalheiro, Teixeira, 2018), atualmente utiliza-se equinocandinas e formulações lipossomais de anfotericina B no tratamento contra biofilmes, uma vez que, nesses

casos, esses fármacos demonstram ser mais eficientes que os grupos azólicos (Ramage, Robertson, Williams, 2014; Costa-Orlandi *et al.* 2017).

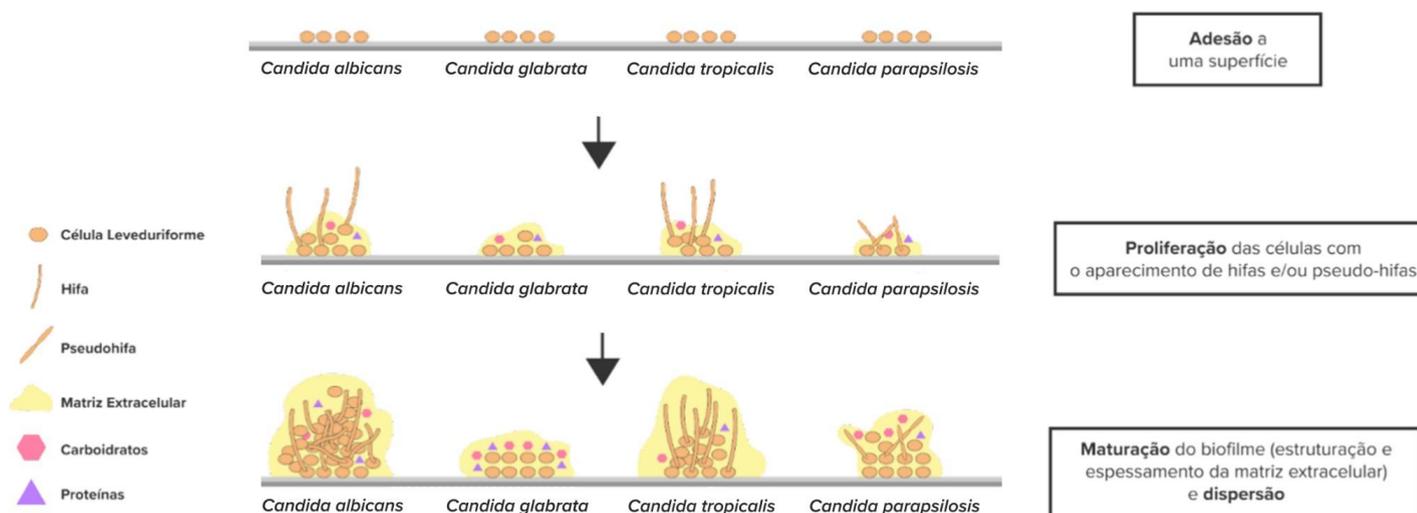


Figura 1. Processo de formação de biofilme entre as diferentes espécies de *Candida*.

Uma taxa de mortalidade de aproximadamente 60% é observada em infecções hospitalares causadas por fungos formadores de biofilme. Dessas infecções, cerca de 80% correspondem a infecções pelo gênero *Candida* (Langer *et al.*, 2018). A maioria dos casos de infecção grave por *Candida* spp. está associada à formação de biofilmes em superfícies bióticas e abióticas (Ramage *et al.*, 2005; Douglas, 2003). Esses biofilmes são clinicamente importantes pois costumam ser resistentes aos antifúngicos, como o fluconazol e a anfotericina B (Bink *et al.*, 2011). Biofilme de *C. albicans* pode apresentar resistência cinco a oito vezes maior aos antifúngicos do que quando comparado às células planctônicas (Cavalheiro, Teixeira, 2018). Os fármacos fluconazol e voriconazol, de forma geral, não costumam apresentar ação eficaz contra os biofilmes de *Candida* spp. (Ziccardi *et al.*, 2015).

Uma estratégia utilizada para tentar contornar a problemática da formação de biofilme em dispositivos médicos, é a “*antifungal lock therapy*”, ou terapia de bloqueio antifúngico, na qual o catéter (ou outro dispositivo) é colocado em contato com uma solução antifúngica com concentrações 100-1000 vezes maiores do que aquelas utilizadas frente a células planctônicas. A solução é deixada em contato

com o dispositivo por um período, antes de ser implantado no paciente, para minimizar e/ou prevenir a colonização do dispositivo ou então para esterilizar um dispositivo previamente contaminado (Justo, Bookstaver, 2014; Atriwal *et al.*, 2021). Estudos realizados por Cateau, Berjeaud e Imbert (2011), em cateteres de silicone infectados com isolados de *C. albicans* e *C. glabrata*, demonstraram que os fármacos micafungina, caspofungina e posaconazol, quando utilizados na técnica de “*Antifungal Lock Therapy*”, ajudaram a diminuir os biofilmes, sendo a micafungina a mais eficaz.

O gênero *Trichosporon* é considerado produtor moderado de biofilme e apresentam riscos à saúde humana, uma vez que podem se aderir aos dispositivos implantados causando uma infecção no paciente já fragilizado. Uma vez formado, esse biofilme auxilia na invasão da superfície, na evasão celular a resposta imune e na suscetibilidade aos antifúngicos. Em ensaios realizados, as células do biofilme de *T. asahii* eram altamente resistentes aos antifúngicos testados, anfotericina B, caspofungina, fluconazol e voriconazol, quando comparados com as células planctônicas. Alguns autores sugerem o uso de associação de fármacos, como voriconazol e anfotericina B, como uma potencial opção de tratamento nos casos de fungemia por *Trichosporon* sp. (Mehta *et al.*, 2021; Tiseo *et al.*, 2021).

3.4. Fármacos antifúngicos

Os principais antifúngicos disponíveis possuem como alvo terapêutico a síntese de DNA e proteínas, a parede celular fúngica e componentes da membrana plasmática (Pfaller, 2012; Scorzoni *et al.*, 2017). Atualmente há cinco principais classes de antifúngicos utilizadas comercialmente: azóis, equinocandinas, polienos, alilaminas e análogos da pirimidina (Pfaller, 2012; Flevari *et al.*, 2013; Fuentesfria *et al.*, 2017) Alguns antifúngicos têm como alvo principal o ergosterol, inibindo sua biossíntese, como os azóis e alilaminas (Kathiravan *et al.*, 2012; Ngo *et al.*, 2016), ou ligando-se a ele, como os polienos, levando a formação de poros na membrana celular fúngica (Odds, 2003; Walsh *et al.*, 2008; Baginski, Czub, 2009). As equinocandinas agem na parede celular inibindo a síntese de β -glucano, causando estresse na parede e levando a lise celular (Kathiravan *et al.*, 2012; Song, Stevens, 2016). Nucleotídeos pirimidínicos atuam inibindo a síntese de DNA (Kathiravan *et al.*, 2012; Atriwal *et al.*, 2021).

3.4.1. Polienos

Os polienos foram os primeiros fármacos antifúngicos de uso clínico, são fungicidas de amplo espectro, atuando tanto frente a fungos filamentosos quanto a leveduriformes. Os fármacos nistatina, natamicina e anfotericina B, fazem parte da classe dos polienos. Esses fármacos são de origem natural e obtidos a partir dos actinomicetos do gênero *Streptomyces* (Nett & Andes, 2016; Thomaz *et al.*, 2022). Os polienos agem ligando-se ao ergosterol presente na membrana celular fúngica. Então, forma-se um complexo que aumenta a permeabilidade celular por meio de poros que atravessam a membrana, acarretando no extravasamento do material intracelular e consequentemente morte da célula fúngica (Gonzalez *et al.*, 2017). Há poucos relatos de resistência a esses antifúngicos, entretanto devido a sua afinidade por esteróis, como o colesterol humano, acabam acarretando em alta toxicidade ao paciente, principalmente nefrotoxicidade, podendo acarretar em doenças renais e, assim, não são indicados a pacientes em hemodiálise ou que possuam outras patologias renais (Chatelon *et al.*, 2019; Thomaz *et al.*, 2022). A nistatina é utilizada principalmente para o tratamento de candidíases e a natamicina para os casos de ceratite fúngica, principalmente em ceratites causadas por fungos filamentosos, como o *Fusarium* spp., ambas são de uso tópico devido a sua alta toxicidade e baixa absorção no intestino (Chatelon *et al.*, 2019). A administração de anfotericina B é por via intravenosa, uma vez que possui baixa disponibilidade oral. Apresenta diversas reações adversas, associadas às funções gastrointestinais, hepática e renal (Muller *et al.*, 2013; Butani *et al.*, 2014).

3.4.2. Azóis

Os azóis são fármacos fungistáticos, de amplo espectro, mas que apresentam limitações para fungos filamentosos e algumas espécies intrinsecamente resistentes. Fazem parte dessa classe os fármacos fluconazol, itraconazol, cetoconazol, posaconazol e voriconazol (Scorzoni *et al.*, 2017; Thomaz *et al.*, 2022). Os azóis também podem ser classificados em dois grupos, imidazóis (clotrimazol, miconazol, cetoconazol) e triazóis (itraconazol, fluconazol, voriconazol e posaconazol). Os imidazóis formam a primeira geração, porém, apresentaram alta toxicidade, efeitos colaterais adversos e interações medicamentosas. Atualmente, seu uso é restrito apenas para administração tópica, sendo substituídos pelos

triazóis, (Prasad, 2017). O itraconazol e o fluconazol fazem parte da primeira geração de triazóis, apresentando ampla atividade e segurança, entretanto apresentaram ação limitada contra espécies de *Scedosporium*, *Fusarium* e *Mucorales*. Por outro lado, o voriconazol e o posaconazol fazem parte da segunda geração de triazóis, apresentando um amplo espectro e ação fungicida (Scorzoni *et al.*, 2017; Thomaz *et al.*, 2022). Esses fármacos atuam inibindo a enzima lanosterol-14- α -desmetilase, uma das principais enzimas envolvidas na rota de biossíntese do ergosterol fúngico, consequentemente inibindo a formação do ergosterol na membrana celular e impedindo o crescimento e a replicação celular. Esse bloqueio também resulta em um acúmulo de precursores que são tóxicos à célula fúngica (Pappas *et al.*, 2018; Chatelon *et al.*, 2019). O fluconazol é o fármaco de primeira escolha no tratamento de candidíases superficiais e mucosas, pois possui uma boa disponibilidade oral e segurança tolerada para o paciente. A sua limitação é devido ao aumento dos casos de seleção de cepas resistentes, principalmente em espécies de *Candida* não-*albicans* (Nett & Andes, 2016; (Cavalheiro, Teixeira, 2018). O voriconazol possui um espectro de ação mais amplo que o fluconazol, sendo eficaz para espécies de *Candida* que possuem menor susceptibilidade frente ao fluconazol, como *C. glabrata*. Além disso, o voriconazol é indicado como o principal tratamento em casos de aspergilose invasiva e é amplamente utilizado para o tratamento de candidemias, sendo mais efetivo que o fluconazol e com similar eficácia quando comparado à anfotericina B (Nett, Andes, 2016; Ben-Ami, 2018; Chatelon *et al.*, 2019).

3.4.3. Equinocandinas

As equinocandinas são a última linha de antifúngicos comerciais atualmente disponíveis. Fazem parte dessa classe a anidulafungina, a micafungina e a caspofungina. Esses fármacos são administrados pela via parenteral, pois possuem baixa absorção no trato gastrointestinal, possuem ação fungicida e ampla ação frente a maioria das leveduras, sendo a primeira escolha para o tratamento de candidíases sistêmicas (Thomaz *et al.*, 2022). Quando administrados frente à espécies de *Candida* e *Saccharomyces* possuem ação fungicida, entretanto, frente a espécies de *Aspergillus*, são considerados fungistáticos, além de não possuírem ação frente aos gêneros *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Trichosporon*, *Rhodotorula* e

Scedosporium (Perlin *et al.*, 2017). As equinocandinas apresentam alvo de ação seletivo, afetando a síntese de β -glucana, polissacarídeo essencial e principal constituinte da paredes celular fúngica, causando rupturas na mesma e, conseqüentemente, promovendo a morte das células fúngicas. Portanto, esses fármacos não agem sobre as células humanas, tornando-os mais seguros quando comparados aos demais antifúngicos (Nett & Andes, 2016; Chatelon *et al.*, 2019; Thomaz *et al.*, 2022).

3.4.4. Análogos de pirimidina

O principal representante dos análogos da pirimidina é a flucitosina, a qual possui atividade contra espécies de leveduras como *Candida*, *Cryptococcus* e *Saccharomyces*, porém não apresenta ação frente às espécies de *Aspergillus* e Zigomicetos. Seu mecanismo de ação interfere no metabolismo da pirimidina, síntese de ácidos nucleicos e na síntese de proteínas da célula fúngica (Campoy, Adrio, 2017). É comum a seleção de resistência fúngica frente à flucitosina. Assim, uma alternativa é o uso da terapia combinada com outros antifúngicos, como fluconazol e a anfotericina B (Perfect, 2017).

3.4.5. Alilaminas

O mecanismo de ação das alilaminas ocorre através da inibição da enzima esqualeno epoxidase, uma das enzimas responsáveis pela biossíntese do ergosterol, ocasionando o aumento da permeabilidade e ruptura da célula fúngica (Campoy, Adrio, 2017). A terbinafina é o principal representante dessa classe, apresentando amplo espectro de ação frente a infecções dermatofíticas e exibem baixa eficácia para leveduras (Campoy, Adrio, 2017; Thomaz *et al.*, 2022)

3.4.6. Outros fármacos antifúngicos

O ciclopirox olamina é um derivado sintético da hidroxipiridina e é considerado um inibidor do processo de transporte intracelular, agindo como um quelante de cátions trivalentes, como Fe^{3+} e Al^{3+} . Tal mecanismo resulta na inibição de enzimas metais-dependentes, como citocromos, catalases e peroxidases, apresentando um amplo espectro de ação frente a *Candida* spp, *Fusarium* spp e dermatófitos (Shen & Huang, 2016; Campoy, Adrio, 2017). A

griseofulvina, um metabólito natural do fungo *Penicillium griseofulvum*, age no núcleo da célula fúngica, ligando-se com a tubulina e inibindo a síntese de microtúbulos, interrompendo a divisão celular. Esse antifúngico é eficaz frente a dermatófitos, mas apresenta pouca atividade frente a outros fungos filamentosos e leveduras (Sigurgeirsson, 2016; Campoy, Adrio, 2017). A amorolfina pertence à classe das morfolinas e a sua ação ocorre na membrana celular fúngica, inibindo enzimas essenciais da biossíntese do ergosterol, resultando na inibição do crescimento celular, e acúmulo de produtos tóxicos no interior da célula. Esse fármaco é utilizado para o tratamento tópico de onicomicoses, principalmente comercializado na forma de esmalte, podendo apresentar atividade fungistática e fungicida, dependendo da concentração utilizada (Campoy, Adrio, 2017).

3.5. Problemática e desafios da terapia antifúngica atual

Ao longo dos anos com o uso desenfreado de antifúngicos de uso clínico e agrícola, as espécies fúngicas desenvolveram processos adaptativos para suportar essa pressão. Assim, esses organismos expressam diferentes mecanismos de resistência frente aos antifúngicos disponíveis comercialmente, tornando-os cada vez menos efetivos no combate das infecções fúngicas (Ribas *et al.*, 2016; Scorzoni *et al.*, 2017). Além da problemática da resistência fúngica, a busca por novos agentes possui diversas limitações, como o perfil de segurança dos medicamentos, toxicidade, farmacocinética, efeitos colaterais indesejáveis, interações medicamentosas, alto custo e espectro de atividade limitado (Pfaller, 2012; Pianalto, Alspaugh, 2016; Scorzoni *et al.*, 2017). Os tratamentos com antifúngicos são longos, dispendiosos, muitas vezes possuem baixa adesão pelos pacientes, além de seus efeitos adversos à saúde do indivíduo (Pappas *et al.*, 2018). A formação de biofilme fúngico está relacionada à dificuldade de tratamento e cronicidade das infecções (Mohandas, Ballal, 2011; Borghi, Borgo, Morace, 2016). A eficácia do tratamento depende de diversos fatores, como o estado imunológico do indivíduo, o diagnóstico precoce e correto, bem como o tratamento adequado para o isolado fúngico causador da infecção, por isso, exames laboratoriais associados à avaliação da suscetibilidade antifúngica são de extrema importância para que o paciente possua o melhor prognóstico (Borghi, Borgo, Morace, 2016).

Uma das grandes dificuldades na busca por novos agentes antifúngicos é o fato de os fungos também serem organismos eucariotos, havendo semelhança da célula fúngica com a do hospedeiro humano, dificultando a busca por alvos de ação com seletividade fúngica e, com isso, ausência de toxicidade ao paciente (Perlin *et al.*, 2017; Rodrigues, Nosanchuck, 2020). O último antifúngico aprovado foi a anidulafungina, há 16 anos atrás, e atualmente ainda seguimos na busca por novas opções de tratamento e novos alvos terapêuticos (Fuentefria *et al.*, 2017).

3.6 Resistência fúngica

Os fungos expressam alguns mecanismos de seleção de resistência, como o aumento da expressão das bombas de efluxo, formação de biofilme, desvios metabólicos, mutações de genes, alteração ou super expressão dos alvos do fármaco (Gonçalves *et al.*, 2016; Sanglard, 2016; Scorzoni *et al.*, 2017). Mutações nos genes FKS1 e FKS2 levam a substituições de aminoácidos na enzima β -1,3-D-glucanase, acarretando em uma redução da sensibilidade das equinocandinas com essa enzima (Campoy, Adrio, 2017; Pristov; Ghannoum, 2019). A resistência aos azóis pode estar relacionada a mutações nos genes ERG11, ERG1, ERG3, ERG7, ERG9 e ERG25, envolvidos na biossíntese de ergosterol, alvo celular dessa classe de antifúngicos (Campoy, Adrio, 2017). Mutações pontuais no genes FCY2, que pode promover alteração nas enzimas responsáveis pela absorção dos antifúngicos, e nos FCY1 e FUR1, envolvidas nas enzimas responsáveis pela metabolização do fármaco, podem resultar numa resistência aos análogos de pirimidina, como a flucitosina (Campoy, Adrio, 2017). Assim, a resistência fúngica pode ser classificada como microbiológica (*in vitro*), sendo uma característica do fungo, ou clínica (*in vivo*), relacionada ao hospedeiro ou aos antifúngicos (Pai, Ganavalli, Kikkeri, 2018). A resistência microbiológica ocorre quando não há susceptibilidade de um fungo com um antifúngico a partir do observado nos testes de suscetibilidade antifúngica *in vitro*, podendo tal característica ser decorrente de um caso de resistência intrínseca, em que a resistência é uma característica do fungo sem uma exposição prévia ao antifúngico; ou adquirida, sendo desenvolvida após sucessivas exposições ao antifúngico. Algumas espécies já são conhecidas como intrinsecamente resistentes a determinados antifúngicos, como a *C. krusei* ao fluconazol, *Cryptococcus*

neoformans às equinocandinas e *Candida não-albicans* à flucitosina (White, Marr, Bowden, 1998; Kanafani, Perfect, 2008; Pai, Ganavalli, Kikkeri, 2018). A resistência adquirida pode ser observada em algumas cepas após exposição prévia ao antifúngico, como cepas de *T. rubrum* resistentes à terbinafina e *C. albicans* ao fluconazol (Pai, Ganavalli, Kikkeri, 2018).

Na resistência clínica ocorre a falha no tratamento da infecção fúngica mesmo com a administração de um antifúngico que apresentou atividade *in vitro* frente à espécie (Pai, Ganavalli, Kikkeri, 2018). Essa resistência depende de múltiplos fatores que envolvem o hospedeiro e os medicamentos, como: imunidade do paciente, natureza e farmacocinética do fármaco, uso de antifúngico inadequado, baixa dosagem, longa duração do tratamento, interações medicamentosas, reações adversas e custo da terapia. Para se obter sucesso no tratamento antifúngico, faz-se necessário o uso prudente dos antifúngicos nas dosagens e tempo de tratamento adequado (Pai, Ganavalli, Kikkeri, 2018). A resistência observada em *Candida* spp. frente aos antifúngicos azólicos, é um dos maiores desafios da terapêutica clínica atualmente. Algumas cepas de *C. krusei* apresentam resistência intrínseca aos azóis, algumas espécies de *Candida* apresentam resistência às equinocandinas e multirresistência a mais de uma classe de antifúngico, como a *C. glabrata* (Pfaller, 2012; Perlin *et al.*, 2017; Revie *et al.*, 2018). Estudo realizado em 2013, com isolados clínicos de 31 países demonstrou que 11,9% das cepas de *C. glabrata* e 11,6% das cepas de *C. tropicalis* apresentaram resistência ao fluconazol (Castanheira *et al.*, 2016). Cerca de 10% das cepas de *C. albicans* apresentam resistência primária à flucitosina, mesmo sem haver exposição prévia ao fármaco (Scorzoni *et al.*, 2017). Martins *et al.* (2016) relata em seu estudo que dentre 114 leveduras do gênero *Candida* testadas, 22% foram resistentes ao fluconazol, 47% resistentes ao itraconazol, 16% ao miconazol e 11% ao cetoconazol, sendo *C. tropicalis* e *C. glabrata* as espécies mais resistentes. Lei *et al.* (2018) relatam uma maior atividade dos antifúngicos voriconazol e itraconazol frente a leveduras do gênero *Candida* sp. quando comparados ao fluconazol em estudos *in vitro*. Segundo Perlin *et al.* (2017) foram relatadas infecções fúngicas resistentes a anfotericina B causadas pelas espécies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. rugosa*, *C. lusitaniae* e *C. tropicalis*.

Em estudo realizado por Singh *et al.* (2018), dentre os vinte e quatro isolados clínicos do gênero *Trichosporon* testados, 79,16% foram identificados como *T. asahii*. Os isolados relacionados a infecções superficiais apresentaram resistência ao fluconazol, itraconazol e as equinocandinas, dois isolados foram resistentes ao voriconazol e todos foram susceptíveis ao cetoconazol (Singh *et al.*, 2018). Apesar de incomum, observou-se o aumento de casos de cepas multirresistentes a, no mínimo, duas classes de antifúngicos, como cepas dos gêneros *Candida*, *Aspergillus*, *Microsporium*, *Trichophyton* e *Fusarium* (Martins *et al.*, 2016; Campoy & Adrio, 2017). Uma grande preocupação atual para as autoridades em saúde pública é a emergência da levedura *C. auris*, intrínsecamente resistente a diferentes classes de antifúngicos, apresentando altas taxas de mortalidade ao paciente (Sanyaolu *et al.*, 2022).

3.7. Perspectivas para superação dos desafios na terapêutica fúngica

Diante do cenário atual das infecções fúngicas e suas consequências a saúde humana e animal, novas abordagens e estratégias são necessárias para contornar essa problemática. Sendo desde o desenvolvimento de novos medicamentos antifúngicos, até otimização da dosagem, melhores diagnósticos, exames de suscetibilidade e estratégias como a terapia combinada e reposicionamento de fármacos (Livengood, Drew, Perfect, 2020; Rodrigues, Nosanchuck, 2020).

3.7.1. Associação de fármacos

Uma das formas de contornar a problemática da resistência fúngica e a dificuldade de se obter novos agentes antifúngicos eficazes é o uso da terapia antifúngica combinada, que permite a atuação em mais de um alvo celular, potencialização da ação – promovendo uma ação sinérgica, maior espectro de atividade e, com isso, menor toxicidade devido a menor dosagem utilizada. Como consequência há a possibilidade de reduzir a ocorrência de microrganismos resistentes. A estratégia de associação de medicamentos já é reconhecida e amplamente utilizada na clínica médica para o tratamento de outras doenças, como HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana), tuberculose e malária (Shrestha, Fosso,

Garneau-Tsodikova, 2015; Campitelli *et al.*, 2017; Dala Lana *et al.*, 2018; Danielli *et al.*, 2018; Pai, Ganavalli, Kikkeri, 2018). Ao escolher os fármacos a serem combinados, deve-se selecionar aqueles que possuem alvos de ação diferentes e que não possuam os mesmos mecanismos de resistência, além de apresentarem toxicidade reduzida (Anighoro *et al.*, 2014). Uma das dificuldades da terapia combinada é fazer a correlação da eficácia observada *in vitro* com a eficácia *in vivo* (Livengood, Drew, Perfect, 2020). A terapia combinada tem se demonstrado uma alternativa eficaz e interessante no tratamento de dermatofitoses, principalmente em infecções resistentes, recorrentes e em casos crônicos (Tamura *et al.*, 2014; Scorzoni *et al.*, 2017).

Segundo Baran *et al.* (2000), a associação de terbinafina e amorolfina apresentou resultados positivos frente a casos de onicomicoses graves. Romano *et al.* (2005) relataram eficácia no tratamento de onicomicoses causadas por dermatófitos utilizando associações entre a terbinafina, ciclopirox olamina, imidazol e um antifúngico de uso tópico. Shrestha *et al.* (2015) relataram os efeitos da combinação sinérgica entre análogos da tobramicina e quatro azólicos (fluconazol, itraconazol, posaconazol e voriconazol) frente a maioria das cepas de *C. albicans* testadas. A terapia combinada com triazóis e equinocandinas tem sido usada com a esperança de melhorar os resultados em relação à monoterapia no tratamento de micoses invasivas causadas por *Aspergillus*, *Candida* e *Cryptococcus* (Panackal, 2016; Pai, Ganavalli, Kikkeri, 2018; Bidaud *et al.*, 2019).

A associação entre anfotericina B e flucitosina tem sido descrita no tratamento de meningite criptocócica, sendo superior ao uso isolado de anfotericina B (Chang *et al.*, 2017; Livengood, Drew, Perfect, 2020). Laurent e Monod (2017) relatam efeito sinérgico de amorolfina associada a derivados azólicos. Sharma *et al.* (2019) relatam que a combinação entre itraconazol e terbinafina foi efetiva para dermatófitos. Perfect (2017) relata que, apesar de não ser o tratamento clínico padrão, a adição de um antibacteriano inibidor da RNA polimerase, como a rifampicina, demonstrou aumentar a atividade antifúngica da anfotericina B em estudos *in vitro*. Segundo Liu *et al.* (2016), bloqueadores dos canais de cálcio, como o verapamil, também amplificam a potência do antifúngico fluconazol. A combinação de anidulafungina e anfotericina B apresentou ação sinérgica *in vitro*, além disso, apresentou excelente ação inibindo a formação de biofilme de *Candida* em cateter

venoso, sendo uma alternativa promissora (Reginatto *et al.*, 2020). Alguns estudos sugerem a associação de voriconazol e anfotericina B, como um potencial tratamento em casos de fungemia por *Trichosporon* (Tiseo *et al.*, 2021).

3.7.5. Reposicionamento de fármacos

A descoberta inicial de um medicamento até sua aprovação pelos órgãos reguladores pode levar até vinte anos e o seu custo pode alcançar \$2 bilhões de dólares. Nesse contraponto, apenas 5% dos novos compostos investigados obtêm sucesso nos ensaios clínicos e são introduzidos no mercado (Wall, Lopez-Ribot, 2020). Dessa forma, o reposicionamento de fármacos é uma alternativa terapêutica que, assim como a terapia combinada, vem sendo adotado no combate das infecções fúngicas resistentes e em casos de recidivas. O reposicionamento de fármacos é um processo de menor custo e menos dispendioso comparado ao desenvolvimento de um novo antifúngico, além de já se possuir as informações sobre toxicidade, tolerabilidade e farmacocinética conhecidas e estabelecidas (Anighoro *et al.*, 2014; Pianalto, Alspaugh, 2016; Corsello *et al.*, 2017; Fuentesfria *et al.*, 2017; Wall, Lopez-Ribot, 2020).

Estudos sobre o reposicionamento de diversos fármacos vêm sendo abordados nas últimas décadas. A talidomida, utilizada inicialmente para tratar enjoos em mulheres grávidas na década de 1950 foi banida por muitos anos em todo o mundo devido aos seus efeitos colaterais graves nos fetos. Entretanto, na década de 1960 houve o seu reposicionamento, o qual é atualmente o principal tratamento para a Hanseníase. Além disso, seu uso também foi aprovado no tratamento de mieloma múltiplo (Rehman, Arfons, Lazarus, 2011; Schein, 2020; Wall, Lopez-Ribot, 2020). A 5-flucitosina foi inicialmente desenvolvida como um medicamento anticancerígeno, entretanto apresentou baixa eficácia, posteriormente foi estudada e reposicionada como um agente antifúngico (Grunberg, Titsworth, Bennett, 1963; Wall, Lopez-Ribot, 2020). Estudos recentes sobre reposicionamento de fármacos demonstram que o tamoxifeno, agonista do receptor de estrogênio, usado há décadas no tratamento de câncer de mama, apresentou atividade anti-criptocócica (Dolan *et al.*, 2009; Butts *et al.*, 2014) e atividade frente à *S. cerevisiae* e *C. albicans* (Wiseman, Cannon, Arnstein, 1989; Beggs, 1994; Pianalto, Alspaugh, 2016). A sertralina, medicamento antidepressivo, apresentou ação contra cepas de *Cryptococcus*, e potencializou o

tratamento com fluconazol, devido a sua capacidade de penetração no sistema nervoso central (Nayak, Xu, 2010; Zhai *et al.*, 2012, Wall, Lopez-Ribot, 2020). O reposicionamento da nitroxolina, fármaco destaque deste estudo, vem sendo estudado como opção de tratamento de diversas doenças, desde infecções bacterianas, fúngicas e parasitárias, a tratamento de doenças neurodegenerativas e diversos tipo de câncer (Sosič *et al.*, 2018; Mitrović, Kos, 2019; Van Hau *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2020).

3.8. Derivados da 8-hidroxiquinolina

Os derivados quinolínicos apresentam diversas atividades biológicas, como ação antiparasitária, antimalárica, antifúngica e antibacteriana (Keri, Patil, 2014; El-Gamal *et al.*, 2015). O núcleo quinolínico (**Figura 2**) apresenta uma grande versatilidade, permitindo o desenvolvimento de diferentes e novos derivados (Solomon, Lee, 2011; Joaquim *et al.*, 2019; Machado *et al.*, 2020). Como exemplo, a 8-hidroxiquinolina (**Figura 2**) e os seus derivados, pertencentes a uma subclasse das quinolinas, vêm sendo amplamente explorados devido ao seu potencial anticâncer (Chan-On *et al.*, 2015), neuroprotetor (Suwanjang *et al.*, 2016), antimicrobiano (Cherdtrakulkiat *et al.*, 2016; Abouelhassan *et al.*, 2017) e antifúngico (Song, Stevens, 2016; Oliveri, Vecchio, 2016). Os derivados da 8-hidroxiquinolina mostram um potencial antifúngico interessante, apresentando amplo espectro de ação e atividade antibiofilme, podendo ser uma alternativa às limitações terapêuticas atuais. Seu mecanismo de ação ainda não é totalmente esclarecido, entretanto estudos relatam que o provável mecanismo é através da quelação de metais pelo nitrogênio do anel quinolínico com a 8-hidroxila (Musiol *et al.* 2010; You, Zhang, Ran, 2020).

Um dos membros mais conhecido dessa classe é o clioquinol (5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina), o qual tem sido utilizado nos últimos anos como antimicrobiano de uso tópico e vem demonstrando-se promissor, com potencial tratamento para diversas patologias, como Alzheimer, Parkinson e doença de Huntington (Zhang *et al.*, 2013; Finkelstein *et al.*, 2016; Franklin *et al.*, 2016; Oliveri, Vecchio, 2016). O clioquinol, que é um derivado da 8-hidroxiquinolina, teve, na década de 70, suas formulações orais retiradas do mercado devido a relatos de pacientes japoneses que apresentaram quadros de neuropatia mielo-óptica

subaguda, no entanto, há controvérsias sobre a relação do clioquinol com a doença, e recentemente houve um aumento no interesse do seu potencial terapêutico (Kuru, 2021; Wykowski, Fuentesfria, De Andrade, 2022). Estudos atuais demonstram que o clioquinol inibiu a formação de pseudo-hifas de *C. albicans* (Pippi *et al.*, 2019) e apresentou atividade antifúngica frente a diferentes espécies de *Candida* e fungos dermatofíticos (Pippi *et al.*, 2017; You *et al.*, 2018; Costa *et al.*, 2020; Machado *et al.*, 2020). O clioquinol protegeu totalmente as moscas da espécie *Drosophila melanogaster* da infecção por *Candida albicans* (Pippi *et al.*, 2019). As associações duplas e triplas de clioquinol com ciclopirox e com terbinafina foram sinérgicas para cepas de dermatófitos (Costa *et al.*, 2020). Apresentou também atividade antibiofilme, inibindo 90% da formação e reduzindo a atividade metabólica do biofilme de *Candida* (Pippi *et al.*, 2018); removeu cerca de 80% do biofilme de *Candida* em dispositivos intrauterinos (DIU) (Pippi *et al.*, 2018), em associação com voriconazol e ciclopirox olamina, o clioquinol inibiu cerca de 90% a formação de biofilme de *Fusarium sp.* (Chaves *et al.* 2020). Apesar do seu amplo espectro de ação, o mecanismo de ação antifúngica do clioquinol ainda não está completamente elucidado, porém, relatos demonstram que ele possivelmente atue na parede celular fúngica (Pippi *et al.*, 2019). O PH151, um derivado da 8-hidroxiquinolina, em combinação com o fluconazol, demonstrou potencial como uma alternativa de tratamento ao combate da formação de biofilme de *Candida* em dispositivos de hemodiálise (Rocha *et al.*, 2021). Os derivados PH157 e PH100, apresentaram ação frente a células planctônicas e ao biofilme de *Candida spp.* (Reginatto *et al.*, 2022).

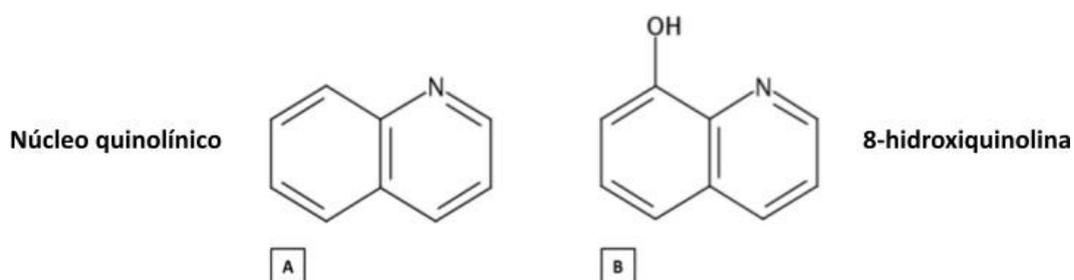


Figura 2. Estrutura química do núcleo quinolínico (A) e da 8-hidroxiquinolina (B).

3.9. Nitroxolina

A nitroxolina (5-nitro-8-hidroxiquinolina) (**Figura 3**) é um fármaco derivado da 8-hidroxiquinolina utilizado desde a década de 1960 como um antibacteriano para o tratamento de infecções urinárias (Kranz *et al.*, 2017; Wijma *et al.*, 2018). A administração oral de nitroxolina demonstrou boa segurança com apenas alguns efeitos colaterais toleráveis, como distúrbios gastrointestinais e algumas reações alérgicas (Naber *et al.*, 2014; Kranz *et al.*, 2017; Puértolas-Balint *et al.*, 2020). Ocorre adsorção completa e rápida no sistema urinário e posteriormente é excretada na urina, onde apresenta principalmente ação bacteriostática, possuindo maior ação em urina ácida do que em alcalina (Naber *et al.*, 2014; Wijma *et al.*, 2018). Apresenta atividade antimicrobiana frente à maioria das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas causadoras de infecção no trato urinário e espécies patogênicas de *Candida* (Naber *et al.*, 2014). Na década de 70, devido aos limitados conhecimentos de farmacologia da época, não foi possível compreender o espectro de ação e janelaterapêutica da nitroxolina, o que fez com que o composto fosse utilizado erroneamente, e assim o fármaco caiu em desuso na clínica médica (Wijma *et al.* 2018). Recentemente houve um aumento no interesse na classe das 8-hidroxiquinolinas e suas diversas aplicabilidades na saúde humana.

A nitroxolina demonstra-se como promissora para diversas aplicabilidades, apresentando potencial antiangiogênico (Shim *et al.*, 2010), ação neuroprotetora (Van Hau *et al.*, 2019), atividade antitumoral sobre diversas linhagens tumorais, como mieloma, câncer de mama, glioma, câncer de pâncreas, câncer de próstata e câncer de bexiga (Sosič *et al.*, 2018; Mitrović, Kos, 2019; Xu *et al.*, 2020), bem como atividade frente a infecções parasitárias, como aquelas causadas pela ameba de vida livre patogênica, *Balamuthia mandrillaris* (Laurie *et al.*, 2018). Apresenta atividade antibacteriana frente a espécies de *Mycoplasma* sp. (Valentine-King *et al.*, 2020), *N. gonorrhoeae* (Fuchs, Hamprecht, 2019), *Escherichia coli*, *A. baumannii*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *Providencia rettgeri* (Abouelhassan *et al.*, 2017; Cherdtrakulkiat *et al.*, 2019), *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* multirresistentes (Hof, Juretschke, 2019) e bactérias produtoras de carbapenemases (Cherdtrakulkiat *et al.*, 2019; Fuchs, Hamprecht, 2019). Em seu estudo, Puértolas-Balint *et al.* (2020) sugere que a ação antibacteriana da nitroxolina ocorra devido a sua ação quelante de íons metálicos bivalentes presentes na célula

bacteriana, resultando em menor aderência a superfícies e morte celular. Também causa rápida inibição da síntese de RNA em leveduras (Naber *et al.*, 2014; Sakka, Gould, 2016). A nitroxolina apresentou atividade antifúngica frente a cepas de *Candida* spp., como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata*, com valores de CIM entre 1-4mg/L (Kranz *et al.*, 2017). Fuchs e colaboradores (2022), demonstraram em seu trabalho que a nitroxolina possui excelente ação antifúngica frente às cepas de *C. auris*, apresentando valores de CIM entre 0,125-1mg/L. O fármaco também apresentou atividade antifúngica moderada frente a cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* (Cherdtrakulkiat *et al.*, 2016).

A atividade antibiofilme bacteriano da nitroxolina também foi relatada, apresentando ação antibiofilme frente às cepas de *Staphylococcus aureus* e *Acinetobacter baumannii* resistentes (Abouelhassan *et al.*, 2017), *Pseudomonas aeruginosa* (Sobke *et al.*, 2012; Sakka, Gould, 2016). Apresentou excelente ação frente às leveduras do gênero *Candida*, sendo um promissor candidato ao tratamento de Candidemias e combate aos biofilmes em dispositivos médicos (Kim, Zilbermintz e Martchenko, 2015; Wijma *et al.*, 2018; Cherdtrakulkiat *et al.*, 2019). No estudo de Molina *et al.* (1991), a nitroxolina apresentou atividade antifúngica frente a espécies de *Candida in vitro*, a qual foi superior à ação dos imidazóis, e semelhante à eficácia da anfotericina B. Assim, a nitroxolina apresenta um potencial uso hospitalar, especialmente em infecções relacionadas a cateteres e outros dispositivos médicos (Sakka, Gould, 2016).

Com base no contexto apresentado, é evidente a necessidade de novas abordagens para contornar a problemática de formação de biofilme, resistência fúngica, e a limitação na terapia antifúngica. Assim, este projeto buscou prospectar novas alternativas ao combate às infecções fúngicas e formação de biofilme, utilizando-se o fármaco nitroxolina e sua associação com outros antimicrobianos frente a espécies de fungos leveduriformes de interesse clínico (Fuentefria *et al.*, 2017; Livengood, Drew e Perfect, 2020).

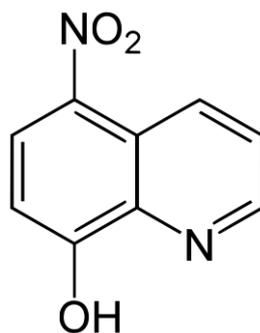


Figura 3. Estrutura química do fármaco nitroxolina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local de trabalho

Os experimentos foram realizados nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Micologia Aplicada (LPMA), no Anexo II da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

4.2. Cepas fúngicas

Para este estudo foram selecionadas 22 cepas pertencentes às espécies fúngicas leveduriformes de importância clínica na formação de biofilme. Assim, foram utilizadas cepas das espécies de *Candida* spp. (*C. albicans* (CA MT02, CA MT04 e CA MT05), *C. tropicalis* (ATCC 750 e CT MT28), *C. krusei* (ATCC 6258, CK MT01 e CK MT02), *C. parapsilosis* (CP MT34, CP MT03 e CP MT19), *C. glabrata* (CG MT01, CG MT02 e CG MT29), *C. lusitanae* (CL MT01, CL MT02 e CL MT06), *C. haemulonii* (CH MT07, CH MT02 e CH MT06) e 2 cepas de *Trichosporon asahii* (TAH 05 e TA RL19) nos ensaios de avaliação da concentração inibitória mínima (CIM). Posteriormente foram selecionadas uma cepa de cada espécie para os demais ensaios. As cepas encontram-se depositadas e registradas na coleção de fungos do Laboratório de Pesquisa em Micologia Aplicada (LPMA) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os isolados foram identificados por MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight; Shimadzu*), e também foram utilizadas cepas padrão provenientes da ATCC (*American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA*).

4.3. Fármacos

O fármaco nitroxolina (NTX) (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e os

antifúngicos caspofungina (CSP) (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), anfotericina B (AMB) (InLab, São Paulo, Brasil) e fluconazol (FLC) (Pharma Nostra, São Paulo, Brasil), todos foram obtidos comercialmente. A solução estoque de FLC foi preparada em água destilada estéril e as demais soluções foram preparadas em DMSO (Dimetilsulfóxido; Sigma-Aldrich), de modo que nos ensaios fosse obtido uma concentração máxima de 2% de DMSO.

4.4. Teste de suscetibilidade antifúngica

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada através do método de microdiluição em caldo, de acordo com o protocolo da BrCAST (*Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, 2020). As soluções antifúngicas foram preparadas em meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute 1640*; Sigma-Aldrich), nas concentrações finais de 0,031-16 µg/mL para NTX, 0,008-4 µg/mL para CSP, 0,008-4 µg/mL para AMB e 0,25-128 µg/mL para FLC. Os ensaios foram realizados em triplicatas. Os isolados foram cultivados em meio SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*, HiMedia, Índia) por 24h a 35°C. Foram realizadas suspensões com o inóculo fúngico em solução salina 0,85% estéril, sendo ajustados em espectrofotômetro (GT220, *Global Trade Technology*), no comprimento de onda de 530nm, obtendo-se uma turbidez equivalente a $1-5 \times 10^6$ UFC/mL (0,5 na escalada McFarland). Prosseguiu-se com uma diluição de 1:10 em meio RPMI 1640, pH7,0 e tamponado com MOPS (ácido morfolinopropanosulfônico; Dinâmica), obtendo uma concentração de células de $1-5 \times 10^5$ UFC/mL.

Os ensaios foram realizados em placas estéreis de poliestireno de 96 poços de fundo chato. Os fármacos foram microdiluídos de forma seriada em meio RPMI 1640, na proporção de 1:2. Posteriormente foi adicionado o inóculo fúngico, na proporção 1:2 com os fármacos na placa, resultando em uma concentração fúngica final de $0,5-2,5 \times 10^5$ UFC/mL. As microplacas foram incubadas por 24h a 35°C.

A CIM foi definida como a menor concentração de fármaco capaz de inibir o crescimento fúngico total (para nitroxolina), inibir o crescimento em 90% (para anfotericina B) e em 50% (para fluconazol e caspofungina), quando comparado com o controle de crescimento (controle positivo), através da leitura visual e em leitora de microplacas (Kasuaki, comprimento de onda de 450nm), segundo os pontos de corte contidos no documento do BrCAST (2020).

$$CIM = \left[1 - \left(\frac{ABS \text{ poços tratados}}{ABS \text{ poços não tratados}} \right) \right] \times 100$$

ABS poços tratados: absorvância dos poços que foram tratados com os fármacos.

ABS poços não tratados: absorvância dos poços do controle positivo -crescimento fúngico.

4.5. Ensaio de sinergismo (*Checkerboard*)

O efeito das associações duplas e triplas da nitroxolina com os demais fármacos foi avaliado através da técnica de *Checkerboard*. Sendo avaliadas as combinações: NTX-AMB, NTX-CSP, NTX-FLC, NTX-AMB-CSP, NTX-AMB-FLC e NTX-CSP-FLC. Utilizou-se as concentrações de CIM/8, CIM/4, CIM/2, CIM, CIMx2. Os ensaios foram conduzidos em triplicata e incubados por 24h a 35°C. Oito isolados foram avaliados, um de cada espécie: CA MT02, CG MT01, CH MT07, ATCC 6258, CL MT01, CP MT34, ATCC 750 e TAH 05.

O efeito das combinações foi classificado através da determinação do índice de concentração inibitória fracionária (ICIF), definido pela seguinte equação:

Combinação dupla:

$$ICIF = CIF_A + CIF_B = \frac{CIM_A \text{ em combinação}}{CIM_A \text{ sozinho}} + \frac{CIM_B \text{ em combinação}}{CIM_B \text{ sozinho}}$$

Combinação tripla:

$$ICIF = CIF_A + CIF_B + CIF_C = \frac{CIM_A \text{ em combinação}}{CIM_A \text{ sozinho}} + \frac{CIM_B \text{ em combinação}}{CIM_B \text{ sozinho}} + \frac{CIM_C \text{ em combinação}}{CIM_C \text{ sozinho}}$$

Quando o valor de ICIF for >4, a associação é considerada antagônica, quando >0,5 e ≤ 4,0 (combinação dupla) ou >0,75 e ≤ 4,0 (combinação tripla) é considerada indiferente, e quando ≤ 0,5 (combinação dupla) e ≤ 0,75 (combinação tripla) considera-se sinérgica (Costa *et al.*, 2020).

4.6. Inibição da formação do biofilme (IFB)

Avaliou-se a capacidade dos fármacos e da melhor associação em inibir a formação de biofilme em microplacas de poliestireno de 96 poços. Os poços foram pré-tratados com 200µL da solução antifúngica nas concentrações de CIM, CIMx2, CIMx10 e CIMx20 de cada fármaco NTX: 1-160 µg/mL; AMB: 0,25-40 µg/mL; CSP: 0,031-20 µg/mL; FLC: 0,25-2.560 µg/mL e NTX-AMB-CSP: 0,25-40, 0,031-20 e 0,015-10 µg/mL), permanecendo por 48h a 4-8°C. Posteriormente os fármacos foram retirados dos poços das microplacas e lavados com 100 µL de água destilada estéril. Realizou-se uma suspensão de células de cada isolado em meio TSB (*Tryptic soy broth*, InLab, São Paulo, Brasil) na concentração de 10⁶ UFC/mL. O inóculo fúngico foi adicionado na placa, numa diluição de 1:10, sendo 20 µL de inóculo juntamente com 180 µL de meio TSB em cada poço, as placas foram incubadas a 35°C durante 48 horas para a formação do biofilme.

A biomassa do biofilme foi determinada segundo a técnica de Stepanović *et al.* (2007), com modificações. O sobrenadante foi aspirado, e os poços lavados cuidadosamente com água destilada estéril três vezes, para remover as células não aderentes. Fixou-se o biofilme com 150 µL de metanol (Merck; Darmstadt, Alemanha) por 30 minutos. O metanol foi removido, e as placas foram secadas por 30 minutos em temperatura ambiente. O biofilme foi corado com 150 µL de corante cristal violeta (Synth, São Paulo, Brasil), em concentração de 0,5% (p/v) por 30 minutos. O corante foi removido, e os poços lavados até a remoção do excesso de corante. Logo após, foi adicionado 150 µL de etanol 95% (Merck, Darmstadt, Alemanha) para ressuspender o corante, por um período de 30 minutos. 100 µL foram transferidos para outra microplaca de poliestireno de 96 poços e prosseguiu-se a leitura.

A leitura foi realizada na Leitora de Microplacas (Kasuki), em comprimento de onda de 450 nm. Através da média das absorbâncias obtidas nas diferentes concentrações dos fármacos, determinou-se as concentrações capazes de inibir a formação do biofilme em 50% e 90%, representadas como IFB₅₀ e IFB₉₀, respectivamente. O percentual de inibição foi determinado através da relação com o controle não tratado, conforme a fórmula abaixo (Reginatto *et al.*, 2020).

$$IFB = \left[1 - \left(\frac{ABS \text{ poços tratados}}{ABS \text{ poços não tratados}} \right) \right] \times 100$$

ABS poços tratados: absorvância dos poços que foram tratados com os fármacos.

ABS poços não tratados: absorvância dos poços do controle positivo -crescimento fúngico.

4.7. Remoção do biofilme (RB)

Avaliou-se a capacidade dos fármacos de remover o biofilme pré-formado em microplaca de poliestireno de 96 poços. Realizou-se uma suspensão de células de cada isolado em meio TSB na concentração de 10^6 UFC/mL. O inóculo fúngico foi adicionado na placa, numa diluição de 1:10, sendo 20 μ L de inóculo juntamente com 180 μ L de meio TSB em cada poço, as placas foram incubadas a 35°C durante 48 horas para a formação do biofilme. O sobrenadante foi aspirado, e os poços lavados cuidadosamente com água destilada estéril três vezes, para remover as células não aderentes. Os poços foram tratados com 200 μ L da solução antifúngica nas concentrações de CIM, CIMx2, CIMx10 e CIMx20 de cada fármaco (NTX: 1-160 μ g/mL; AMB: 0,25-40 μ g/mL; CSP: 0,031-20 μ g/mL; FLC: 0,25-2.560 μ g/mL e NTX-AMB-CSP: 0,25-40, 0,031-20 e 0,015-10 μ g/mL), permanecendo por 24h a 35°C.

A biomassa do biofilme foi avaliada de acordo com a técnica descrita por Stepanović *et al.* (2007), com modificações. O sobrenadante foi aspirado, e os poços lavados cuidadosamente com água destilada estéril três vezes, para remover as células não aderentes. Fixou-se o biofilme com 150 μ L de metanol (Merck; Darmstadt, Alemanha) por 30 minutos. O metanol foi removido, e as placas foram secas por 30 minutos em temperatura ambiente. O biofilme foi corado com 150 μ L de corante cristal violeta (Synth, São Paulo, Brasil), em concentração de 0,5% (p/v) por 30 minutos. O corante foi removido, e os poços lavados até a remoção do excesso de corante. Logo após, foi adicionado 150 μ L de etanol 95% (Merck, Darmstadt, Alemanha) para ressuspender o corante, por um período de 30 minutos. 100 μ L foram transferidos para outra placa microplaca de poliestireno de 96 poços e prosseguiu-se a leitura.

A leitura foi realizada na Leitora de Microplacas (Kasuki), em comprimento de onda de 450 nm. Através da média das absorvâncias obtidas nas diferentes concentrações dos fármacos, determinou-se as concentrações capazes

de remover o biofilme pré-formado em 50% e 90%, representadas como RB₅₀ e RB₉₀, respectivamente. O percentual de inibição foi determinado através da relação com o controle não tratado, conforme a fórmula abaixo (Reginatto *et al.*, 2020).

$$RB = \left[1 - \left(\frac{ABS \text{ poços tratados}}{ABS \text{ poços não tratados}} \right) \right] \times 100$$

ABS poços tratados: absorvância dos poços que foram tratados com os fármacos.

ABS poços não tratados: absorvância dos poços do controle positivo-crescimento fúngico.

4.8. Suscetibilidade do biofilme (CIMB)

A capacidade dos fármacos em matar as células presentes no biofilme pré-formado foi avaliada. Esta técnica visa avaliar a redução da viabilidade celular do biofilme aderido à microplaca. Realizou-se uma suspensão de células de cada isolado em meio TSB na concentração de 10⁶ UFC/mL. O inóculo fúngico foi adicionado na placa, numa diluição de 1:10, sendo 20 µL de inóculo juntamente com 180 µL de meio TSB em cada poço, as placas foram incubadas a 35°C durante 48 horas para a formação do biofilme. O sobrenadante foi aspirado, e os poços lavados cuidadosamente com água destilada estéril três vezes, para remover as células não aderentes. Os poços foram tratados com 200 µL da solução antifúngica nas concentrações de CIM, CIMx2, CIMx10 e CIMx20 de cada fármaco (NTX: 1-160 µg/mL; AMB: 0,25-40 µg/mL; CSP: 0,031-20 µg/mL; FLC: 0,25-2.560 µg/mL e NTX-AMB-CSP: 0,25-40, 0,031-20 e 0,015-10 µg/mL), permanecendo por 24h a 35°C. O sobrenadante foi aspirado, e os poços lavados cuidadosamente com água destilada estéril três vezes, para remover as células não aderentes.

A inibição do biofilme pré-formado foi estimada utilizando-se o corante vital MTT brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, concentração de 0,5 mg/mL. A coloração ocorre através da atividade de desidrogenases mitocondriais, presentes apenas em células metabolicamente viáveis, que irão clivar o anel de tetrazólio, reduzindo o sal MTT e formando cristais insolúveis de formazan E,Z-1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazan (Traba e Liang, 2011; Pippi *et al.*, 2017). Sendo assim, foi adicionado 150 µL de MTT nos poços e incubados durante 3h a 35°C. O corante foi retirado e os cristais de formazan foram extraídos com a

adição e homogeneização de 150 µL de álcool isopropílico. Após um repouso de 5 minutos, 100 µL foram transferidos para outra microplaca e prosseguiu-se a leitura.

A leitura foi realizada na Leitora de Microplacas (Kasuki), em comprimento de onda de 450 nm. Através da média das absorbâncias obtidas nas diferentes concentrações dos fármacos, determinou-se as concentrações capazes de reduzir a atividade metabólica em 50% e 90%, representadas como CIMB₅₀ e CIMB₉₀, respectivamente. O percentual de redução da atividade metabólica foi determinado através da relação com o controle não tratado, conforme a fórmula abaixo (Reginatto *et al.*, 2020).

$$CIMB = \left[1 - \left(\frac{ABS \text{ biofilme tratado}}{ABS \text{ biofilme não tratado}} \right) \right] \times 100$$

ABS biofilme tratado: absorbância dos poços que foram tratados com os fármacos.

ABS biofilme não tratado: absorbância dos poços do controle positivo-formação de biofilme.

4.9. Análise estatística dos dados

As análises estatísticas foram realizadas através de ANOVA One way seguido pelo teste Tukey de comparações múltiplas (software GraphPad Prism; versão 8.0), em que $p < 0,05$ será considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS

7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que:

- A nitroxolina apresentou potencial antifúngico frente às leveduras dos gêneros *Candida* e *Trichosporon*;
- As CIM's para nitroxolina foram baixas (0,5–8 µg/mL), sendo o fármaco eficaz em concentrações pequenas para os gêneros *Candida* e *Trichosporon*;
- Dentre as combinações de nitroxolina com os antifúngicos, a melhor associação encontrada foi NTX-AMB-CSP, a qual apresentou potencial sinérgico para a maioria das cepas avaliadas;
- Nenhuma combinação avaliada apresentou antagonismo, portanto seu uso combinado não traria prejuízos em relação à ação dos fármacos individualmente;

- A nitroxolina e a sua combinação NTX-AMB-CSP apresentaram excelente potencial antibiofilme, possuindo ação na inibição da sua formação, bem como remoção do biofilme pré-formado e sobre a redução da atividade metabólica celular;

- O fármaco nitroxolina apresenta potencial como uma alternativa na prevenção e remoção de biofilmes em dispositivos médicos, possuindo ação antifúngica e antibacteriana;

Por fim, conclui-se que nossos resultados são satisfatórios e de grande relevância, e sugerem uma nova alternativa terapêutica frente às infecções causadas por *Candida* spp. e *Trichosporon* spp. Entretanto, estudos complementares avaliando o comportamento *in vivo* da nitroxolina e da associação NTX-AMB-CSP frente a esses gêneros fúngicos e a seus biofilmes são necessários para que se possa prospectar tais fármacos como uma nova alternativa terapêutica na prevenção da formação de biofilme em dispositivos médicos.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Como citado neste estudo, as infecções fúngicas tornaram-se um problema de saúde pública mundial, principalmente devido à seleção de isolados resistentes e às limitações impostas pelos tratamentos antifúngicos atuais. A prospecção de novos agentes com ação antifúngica e antibiofilme é extremamente necessária para contornar tal problemática, juntamente à a associação e reposicionamento de fármacos, exemplos de algumas estratégias que podem ser utilizadas. Neste estudo, a nitroxolina e sua associação com anfotericina B e caspofungina, demonstram forte potencial como possíveis candidatos a novas terapias para o tratamento de infecções e biofilmes causadas pelos gêneros *Candida* e *Trichosporon*. Portanto, é necessário elucidar e explorar o potencial desse fármaco em estudos futuros, tais como:

Avaliar perfil de toxicidade da combinação NTX-AMB-CSP através de testes *in vivo* utilizando-se animais mamíferos;

Avaliar a eficácia da nitroxolina e da combinação em modelo de infecção *in vivo* com *Drosophyla melanogaster* infectadas com *Candida* spp. e *Trichosporon* spp.;

Avaliar o espectro de ação da nitroxolina e combinação frente a fungos dermatofíticos e filamentosos de interesse clínico;

Avaliar a capacidade da nitroxolina e combinação em inibir e remover o biofilme fúngico em diferentes materiais e dispositivos médicos;

9. REFERÊNCIAS

- Abdullah MN, Mushrif MH, Fahad HM. 2022. Detection of some *Candida albicans* virulence factors isolated from renal failure patients. *Journal Pharm Negative Results*. 13: 831-834.
- Abouelhassan Y, Yang Q, Yousaf H, Nguyen MT, Rolfe M, Schultz GS, et al. 2017. Nitroxoline: a broad-spectrum biofilm-eradicating agent Against pathogenic bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents* 49: 247–251.
- Alim D, Sircaik S, Panwar SL. 2018. The significance of lipids to biofilm formation in *Candida albicans*: An emerging perspective. *Journal of Fungi*, 4: 4.
- Ameen M. 2010. Epidemiology of superficial fungal infections. *Clin Dermatol*. 28:197.
- Anighoro A, Bajorath J, Rastelli G. 2014. Polypharmacology: Challenges and opportunities in drug discovery. *J Med Chem*. 57(1): 74-87.
- Apsemidou A, et al. 2020. *Candida lusitanae* breakthrough fungemia in an immuno-compromised adolescent: case report and review of the literature. *Journal of Fung*. 6(4): 380.
- Arastehfar A, Carvalho A, Nguyen MH, Hedayati MT, Netea MG, Perlin DS, Hoenigl M. 2020. COVID-19-associated candidiasis (CAC): an underestimated complication in the absence of immunological predispositions?. *Journal of Fungi*. 6 (4): 211.
- Atriwal T, Azeem K, Husain FM, Hussain A, Khan MN, Alajmi MF, Abid M. 2021. Mechanistic Understanding of *Candida albicans* Biofilm Formation and Approaches for Its Inhibition. *Front. Microbiol*. 12: 638609.
- Backx M, White PL, Barnes RA. 2014. New fungal diagnostics. *British Journal of Hospital Medicine*. 75(5): 271-276.
- Baginski M, Czub J. 2009. Amphotericin Bandits new derivatives –mode of action. *Curr. Drug Metab*. 10: 459–469.
- Baran R, Feuilhade M, Datry A, Goettmann S, Pietrini P, Viguie C, et al. 2000. A randomized trial of amorolfine 5% solution nail lacquer combined with oral terbinafine compared with terbinafine alone in the treatment of dermatophytic toenail onychomycoses affecting the matrix region. *Br J Dermatol*. 142(6):1177-1183.
- Bassetti M, Bisio F, Di Biagio A, Pierri I, Balocco M, Soro O, et al. 2004. *Trichosporon asahii* infection treated with caspofungin combined with liposomal amphotericin B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 54(2): 575-577.
- Beggs WH. 1994. Comparative activities of miconazole and the anticancer drug

- tamoxifen against *Candida albicans*. J. Antimicrob. Chemother. 34: 186–187.
- Ben-Ami R. 2018. Treatment of invasive candidiasis: A narrative review. J Fungi. 34(1), 186-187.
- Bhagali R, Prabhudesai NP, Prabhudesai MN. 2021. Post COVID-19 opportunistic *candida* retinitis: A case report. Indian J Ophthalmol. 69:987-9.
- Bhattacharya S, Sae-Tia S, Fries BC. 2020. Candidiasis and Mechanisms of Antifungal Resistance. Antibiotics. 9:312.
- Bidaud AL, Botterel F, Chowdhary A, Dannaoui E. 2019. In vitro antifungal combination of flucytosine with amphotericin B, voriconazole, or micafungin against *Candida auris* shows no antagonism. Antimicrob Agents Chemother. 63:1393-19.
- Bink A, Pellens K, Cammue BP, Thevissen K. 2011. Antibiofilm strategies: How to eradicate *Candida* biofilms? Open Mycol. J. 5:29–38.
- Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. 2017. Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. Journal of Fungi. 3(4), 57.
- Borghi E, Borgo F, Morace G. 2016. Fungal Biofilms: Update on Resistance. In: Imbert C. (eds) Fungal Biofilms and related infections. Advances in Experimental Medicine and Biology. 931: 37-47.
- Bouza E, Guinea J, Guembe M. 2015. The Role of Antifungals against *Candida* Biofilm in Catheter-Related Candidemia. Antibiotics. 4:1-17.
- Butani D, Yewale C, Misra A. 2014. Amphotericin B topical microemulsion: formulation, characterization and evaluation. Colloids Surf B Biointerfaces. 116:351- 58.
- Butts A, Koselny K, Chabrier-Roselló Y, Semighini CP, Brown JC, Wang X, *et al.* 2014. Estrogen receptor antagonists are anti-cryptococcal agents that directly bind EF hand proteins and synergize with fluconazole in vivo. mBio. 5:00765–13.
- Castanheira M, Messer SA, Rhomberg PR, Pfaller MA. 2016. Antifungal susceptibility patterns of a global collection of fungal isolates: results of the SENTRY Antifungal Surveillance Program (2013). Diagn Microbiol Infect Dis. 85: 200–04.
- Campitelli M, Zeineddine N, Samaha G, Maslak S. 2017. Combination antifungal therapy: a review of current data. Journal of clinical medicine research. 9(6): 451.
- Campoy S, Adrio JL. 2017. Antifungals. Biochemical Pharmacology. 1(133):86-96.
- Carmona EM, Limper AH. 2017. Overview of Treatment Approaches for Fungal Infections. Clinics in Chest Medicine. 38(3):393-402
- Cateau E, Berjeaud JM, Imbert C. 2011. Possible role of azole and echinocandin lock solutions in the control of *Candida* biofilms associated with silicone. Int J Antimicrob Agents. 37:380–4.
- Cateau E, Rodier MH, Imbert C. 2012. Candidoses associées aux cathéters-Quelle place pour les verrous antifongiques?. médecine/sciences,

- 28(8-9), 740-745.
- Cavalheiro M, Teixeira MC. 2018. *Candida* Biofilms: Threats, challenges, and promising strategies. *Front Med*. 5: 1–15.
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention. **Fungal disease**. 2014. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/fungal>>. Acesso em: 10 out. 2022.
- Chang YL, Yu SJ, Heitman J, Wellington M, YL. 2017. New facets of antifungal therapy. *Virulence*. 8(2): 222–236.
- Chan-On W, Huyen NT, Songtawee N, Suwanjang W, Prachayasittikul S, Prachayasittikul V. 2015. Quinoline-based clioquinol and nitroxoline exhibit anticancer activity inducing FoxM1 inhibition in cholangiocarcinoma cells. *Drug Des. Devel. Ther*. 9: 2033–2047.
- Chatelon J, Cortegiani A, Hammad E, Cassir N, Leone M. 2019. Choosing the Right Antifungal Agent in ICU Patients. *Advances in Therapy*. 36 (12): 3308–3320.
- Chaves MA, Amaral TF, Coutinho NMSR, Kaminski, FA, Teixeira ML, Oliveira FS. 2020. Synergistic association of clioquinol with antifungal drugs against biofilm forms of clinical *Fusarium* isolates. *Mycoses*. 63(10): 1069-1082.
- Cherdtrakulkiat R, Boonpangrak S, Sinthupoom N, Prachayasittikul S, Ruchirawat S, Prachayasittikul V. 2016. Derivatives (halogen, nitro and amino) of 8-hydroxyquinoline with highly potent antimicrobial and antioxidant activities. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 6 (1): 135–141.
- Cherdtrakulkiat R, Lawung R, Nabu S, Tantimavanich S, Sinthupoom N, Prachayasittikul S, Prachayasittikul V. 2019. Nitroxoline: a potent antimicrobial agent against multidrug resistant enterobacteriaceae. *EXCLI Journal*. 18 (1): 445-453.
- Corsello SM, Bittker JA, Liu Z, Gould J, McCarren P, Hirschman JE, et al. 2017. The drug repurposing hub: a next-generation drug library and information resource. *Nat Med*. 23 (4):405-8.
- Costa B, Pippi B, Kaminski TFA, Andrade SF, Fuentefria AM. 2020. In vitro antidermatophytic synergism of double and triple combination of clioquinol with ciclopirox and terbinafine. *Mycoses* 0:1–9.
- Costa-Orlandi CB, Sardi JC, Pitangui NS, De Oliveira HC, Scorzoni L, Galeane MC, et al. 2017. Fungal Biofilms and Polymicrobial Diseases. *Journal Fungi*. 3 (22): 1-24.
- Cuéllar-Cruz, M, López-Romero E, Villagómez-Castro JC, Ruiz-Baca E. 2012. *Candida* species: new insights into biofilm formation. *Future microbiology*, 7(6), 755-771.
- Lana AJD, Pippi B, Carvalho AR, Moraes RC, Kaiser S, Ortega GG, et al. 2018. In Vitro additive effect on griseofulvin and terbinafine combinations against multidrug-resistant dermatophytes. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 54(2).
- Danielli LJ, Pippi B, Duarte JA, Maciel AJ, Lopes W, Machado MM, et al. 2018. Antifungal mechanism of action of *Schinus lentiscifolius* Marchand essential oil and its synergistic effect in vitro with terbinafine and ciclopirox against

- dermatophytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 70(9): 1216-1227.
- Deorukhkar SC, Saini S, Mathew S. 2014. Non-*albicans Candida* infection: an emerging threat. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*.
- Dimondi VP, Townsend ML, Johnson M, Durkin M. 2014. Antifungal Catheter Lock Therapy for the Management of a Persistent *Candida albicans* Bloodstream Infection in an Adult Receiving Hemodialysis. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 34(7): 120–127.
- Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD. 2003. Clinical mycology. *Zygomycosis*, 241-251.
- Dolan K, Montgomery S, Buchheit B, DiDone L, Wellington M, Krysan DJ *et al.* 2009. Antifungal activity of tamoxifen: *in vitro* and *in vivo* activities and mechanistic characterization. *Antimicrob Agents Chemother*. 53:3337–3346.
- Douglas LJ. 2003. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol*. 11: 30–36.
- El-Gamal KMA, Sherbiny FF, El-Morsi AM, Abu-El-khair HE, Eissa IH, El-Sebaei MM. 2015. Design, synthesis and antimicrobial evaluation of some novel quinoline derivatives. *Pharm Pharmacol Int J*. 2:00036.
- Epelbaum O, Chasan R. 2017. Candidemia in the Intensive Care Unit. *Clin Chest Med*. 38:493–509
- Erami M, Raiesi O, Momen-Heravi M, Getso MI, Fakhrehi M, Mehri N, *et al.* 2022. Clinical impact of *Candida* respiratory tract colonization and acute lung infections in critically ill patients with COVID-19 pneumonia. *Microbial Pathogenesis*. 166: 105520.
- Finkelstein DI, Hare DJ, Billings JL, Sedjahtera A, Nurjono M, Arthofer E, *et al.* 2016. Clioquinol improves cognitive, motor function, and microanatomy of the alpha-Synuclein hA53T transgenic mice. *ACS Chem. Neurosci*. 7: 119–129.
- Flevari A, Theodorakopoulou M, Velegriaki A, Armaganidis A, Dimopoulos G. 2013. Treatment of invasive candidiasis in the elderly: a review. *Clin Interv Aging*. 8:1199–1208.
- Franklin RB, Zou J, Zheng Y, Naslund MJ, Costello LC. 2016. Zinc ionophore (clioquinol) inhibition of human ZIP1-deficient prostate tumor growth in the mouse ectopic xenograft model: a zinc approach for the efficacious treatment of prostate cancer. *Int. J. Cancer Clin. Res*. 3: 1–11.
- Fuchs F, Aldejohann AM, Hoffmann AM, Walther G, Kurzai O, Hamprecht AG. 2022. In Vitro Activity of Nitroxoline in Antifungal-Resistant *Candida* Species Isolated from the Urinary Tract. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 02265-21.
- Fuchs F, Hamprecht A. 2019. Susceptibility of carbapenemase-producing Enterobacterales (CPE) to nitroxoline. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 74(10): 2934-2937.
- Fuentefria AM, Pippi B, Dalla Lana DF, Donato KK, de Andrade, SF. 2017. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. *Letters in Applied Microbiology*. 66 (1): 2-13.

- Gabaldón T, Gómez-Molero E, Bader O. 2019. Molecular Typing of *Candida glabrata*. *Mycopathologia*. 185(5), 755-764.
- GAFFI - Global Fund for Fungal Infections. 2018. Disponível em: <<https://www.gaffi.org>> . Acesso em: 8 ago 2022.
- Garnica M, Zambão N, Martins J, Furtado, P. 2022. Impacto Da Covid-19 Na Incidência, Distribuição De Espécies E No Prognóstico Das Infecções De Corrente Sanguínea Por *Candida*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 26: 101725.
- Ghannoum M. 2016. Azole Resistance in Dermatophytes Prevalence and Mechanism of Action. *Journal of the American Podiatric Medical Association*, 106(1): 79-86.
- Gonçalves SS, Souza AC, Chowdhary A, Meis JF, Colombo AL. 2016. Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in *Candida* and *Aspergillus*. *Mycoses*. 59(4), 198-219.
- Gonzalez JM, Rodriguez CA, Agudelo M, Zuluaga AF, Vesga O. 2017. Antifungal pharmacodynamics: Latin America's perspective. *Braz J Infect Dis*. 21(1):79–7.
- Grunberg E, Titsworth E, Bennett M. 1963. Chemotherapeutic activity of 5-fluorocytosine. *Antimicrob Agents Chemother*. 161:566 –568.
- Gu W, Xu D, Sun S. 2015. In vitro models to study *Candida albicans* biofilms. *Journal of Pharmaceutics & Drug Development*. 3: 2348-9782.
- Gupta AK, Daigle D, Carviel JL. 2016. The role of biofilms in onychomycosis. *J Am Acad Dermatol*. 74:1–6.
- Hacioglu M, Birteksoz TAS, Dosler S, Inan N, Otuk G. 2018. In vitro activities of antifungals alone and in combination with tigecycline against *Candida albicans* biofilms. *PeerJ*. 6: 5263.
- Hoeningl M, Seidel D, Sprute R, Cunha C, Oliverio M, Goldman GH, *et al*. 2022. COVID-19-associated fungal infections. *Nature microbiology*. 7(8): 1127-1140.
- Hof H, Juretschke C. 2019. Nitroxoline: an option for the treatment of urinary tract infection with multi-resistant uropathogenic bacteria. *Infection*, 47(3): 493-495.
- Janniger EJ, Kapila R. 2021. Public health issues with *Candida auris* in COVID-19 patients. *World medical & health policy*. 13(4): 766-772, 2021.
- Joaquim AR, Pippi B, Cesare MA, Rocha DA, Boff RT, Staudt, KJ, *et al*. 2018. Rapid tools to gain insights into the interaction dynamics of new 8-hydroxyquinolines with few fungal lines. *Chem Biol Drug Des*. 93 (6):1–11.
- Justo JA, Bookstaver PB. 2014. Antibiotic lock therapy: review of technique and logistical challenges. *Infect. Drug Resist*. 7: 343–363.
- Kadri D, Crater AK, Lee H, Solomon VR, Ananvoranich S. 2014. The potential of quinoline derivatives for the treatment of *Toxoplasma gondii* infection. *Experimental Parasitology*. 145 (1): 135– 144.
- Kanafani ZA, Perfect JR. 2008. Antimicrobial resistance: Resistance to antifungal agents: Mechanisms and clinical impact. *Clin Infect Dis*. 46: 120–8.

- Kassem EM, El-Sawy ER, Abd-Alla HI, Mandour AH, AbdelMogeed D, El-Safty MM. 2012. Synthesis, antimicrobial, and antiviral activities of some new 5-sulphonamido- 8- hydroxyquinoline derivatives. *Archives of Pharmacal Research*. 35 (1): 955–964.
- Kathiravan MK, Salake AB, Chothe AS, Dudhe PB, Watode RP, Mukta MS, *et al.* 2012. The biology and chemistry of antifungal agents: a review. *Bioorg. Med. Chem*. 20: 5678–5698.
- Kaushik N, Pujalte GGA, Reese ST. 2015. Superficial Fungal Infections. Primary care: clinics in office practice. 42(4): 501-516.
- Keri RS, Patil AS. 2014. Quinoline: a promising antitubercular target. *Biomed Pharmacother*. 68:1161–1175.
- Kim K, Zilbermintz L, Martchenko M. 2015. Repurposing FDA approved drugs against the human fungal pathogen, *Candida albicans*. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 14 (1): 14-32.
- Kim JY. 2016. Human fungal pathogens: why should we learn? *J. Microbiol*. 54, 145–148.
- Kranz J, Helbig S, Mandraka F, Schmidt S, Naber KG. 2017. The revival of old antibiotics for treatment of uncomplicated urinary tract infections in the era of antibiotic stewardship. *Current opinion in urology*. 27(2): 127-132.
- Kuru S. 2021. Fifty years after the identification of the cause of SMON. *Clin Neurol* 61:109–114.
- Langer LTA, Staudt KJ, Carmo RL, Alves IA. 2018. Biofilmes em infecção por *Candida*: uma revisão da literatura. *Revista Interdisciplinar em Ciências da Saúde e Biológicas*. 2(2):1-15
- Laurie MT, White CV, Retallack H, Wu W, Moser MS, Sakanari JA, *et al.* 2018. Functional assessment of 2,177 US and international drugs identifies the quinoline nitroxoline as a potent amoebicidal agent against the pathogen *Balamuthia mandrillaris*. *MBio*. 9(5): 02051-18.
- Laurent A, Monod M. 2017. Production of *Trichophyton Rubrum* Microspores in Large Quantities and Its Application to Evaluate Amorolfine/Azole Compound Interactions in Vitro. *Mycoses*. 60(9): 581–86.
- Lei J, Xu J, Wang T. 2018. In vitro susceptibility of *Candida* spp. to fluconazole, itraconazole and voriconazole and the correlation between triazoles susceptibility: results from a five-year study. *Journal de mycologie medicale*, 28(2): 310-313.
- Lima SL, *et al.* 2020. Increasing prevalence of multidrug-resistant *Candida haemulonii* species complex among all yeast cultures collected by a reference laboratory over the past 11 years. *Journal of Fungi*. 6(3):110.
- Livengood SJ, Drew RH, Perfect JR. 2020. Combination Therapy for Invasive Fungal Infections. *Current Fungal Infection Reports*. 14 (01): 40-49.
- Liu S, Yue L, Gu W, Li X, Zhang L, Sun S. 2016. Synergistic effect of fluconazole and calcium channel blockers against resistant *Candida albicans*. *PLoS ONE*. 11: 150859.
- Machado GRM, Diedrich D, Ruaro TC, Zimmer AR, Teixeira ML, Oliveira LF, *et*

- al. 2020. Quinolines derivatives as promising new antifungal candidates for the treatment of candidiasis and dermatophytosis. *Brazilian Journal of Microbiology*. 51(4): 1691-1701.
- Maranhão FCA, Oliveira-Júnior JB, Araújo MAS, Silva DMW, *et al.* 2019. Mycoses in northeastern Brazil: epidemiology and prevalence of fungal species in 8 years of retrospective analysis in Alagoas. *Brazilian Journal of Microbiology*. 50(4): 969-978.
- Martins A, Fuentefria A, Andrade S, Silveira G, Kulkamp I, Pippi B, *et al.* 2016. Caracterização do perfil de susceptibilidade a antifúngicos azólicos de uma micoteca como embasamento para estratégias de combate à candidemias. *Journal of Infection Control*. 5(4).
- Martins MP, Franceschini ACC, Jacob TR, Rossi A, Martinez-Rossi NM. 2016. Compensatory expression of multidrug-resistance genes encoding ABC transporters in dermatophytes. *J Med Microbiol*. 65: 605-610
- Mayser P, Gräser Y. 2020. Superficial fungal infections. *Harper's Textbook of Pediatric Dermatology*. 527-559.
- Mehta V, Nayyar C, Gulati N, Singla N, Rai S, Chandar J. 2021. A Comprehensive Review of *Trichosporon* spp.: An Invasive and Emerging Fungus. *Cureus*. 13(8): 17345.
- Mendoza-Reyes DF, Gómez-Gaviria M, Mora-Montes HM. 2022. *Candida lusitanae*: Biology, pathogenicity, virulence factors, diagnosis, and treatment. *Infection and Drug Resistance*. 23: 5121-5135.
- Ministério da Saúde do Brasil. Número de casos e óbitos por COVID. 2022. Disponível em: <https://infoms.saude.gov.br/extensions/covid-19_html/covid-19_html.html> Acesso em: 10 nov 2022.
- Mitrović A, Kos J. 2019. Nitroxoline: repurposing its antimicrobial to antitumor application. *Acta Biochimica Polonica*. 66(4): 521-531.
- Mohandas V, Ballal M. 2011. Distribution of *Candida* species in different clinical samples and their virulence: Biofilm formation, proteinase and phospholipase production: a study on hospitalized patients in Southern India. *Journal of Global Infectious Diseases*. 3 (1): 4-8.
- Molina JH, Llosá J, Ventosa A. 1991. In vitro activity of nitroxoline against clinical isolates of *Candida* species: Die Aktivitat von Nitroxolin in vitro auf klinische *Candida*-Isolate. *Mycoses*, 34(7-8): 323-325.
- Mora-Montes HM, Lopes-Bezerra LM. 2017. *Current Progress in Medical Mycology*. Springer International Publishing/ Switzerland. 10: 92.
- Moser D, Biere K, Han B, Hoerl M, Schelling G, Chouke´r A and Woehrle T 2021. COVID-19 Impairs Immune Response to *Candida albicans*. *Front. Immunol*. 12:640644.
- Moubasher AH, Abdel-Sater MA, Soliman Z. 2017. Incidence and biodiversity of yeasts, dermatophytes and non-dermatophytes in superficial skin infections in Assiut, Egypt. *Journal de Mycologie Médicale*. 27: 166—179.
- Müller GG, Kara-José N, De Castro RS. 2013. Antifungals in eye infections:

- drugs and routes of Administration. *Rev Bras Oftalmol.* 72(2):132-41.
- Musiol R, Serda M, Hensel-Bielowka S, Polanski J. 2010. Quinoline-based antifungals. *Curr Med Chem.* 17: 1960–1973.
- Naber KG, Niggemann H, Stein G, Stein G. 2014. Review of the literature and individual patients' data meta-analysis on efficacy and tolerance of nitroxoline in the 70 treatment of uncomplicated urinary tract infections. *BMC Infectious Diseases.* 14:628.
- Nayak R, Xu J. 2010. Effects of sertraline hydrochloride and fluconazole combinations on *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Mycology* 1:99 –105.
- Neji S, Hadrich I, Trabelsi H, Abbes S, Cheikhrouhou S, Sellami H, *et al.* 2017. Virulence factors, antifungal susceptibility and molecular mechanisms of azole resistance among *Candida parapsilosis* complex isolates recovered from clinical specimens. *Journal of biomedical science.* 24(67):1-16.
- Nett JE, Andes DR. 2016. Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. *Infectious Disease Clinics of North America.* 30(1):51-83.
- Nett JE, Andes DR. 2020. Contributions of the biofilm matrix to *candida* pathogenesis. *Journal of Fungi.* 6(1): 33–38.
- Ngo HX, Garneau-Tsodikova S, Green KD. 2016. A complex game of hide and seek: the Search for new antifungals. *Med chem comm.* 7: 1285–1306.
- Norberg CMBM, Norberg PRBM, Norberg AN, Mattos AAL, Guerra-Sanches F. 2021. *Candida* infections associated with COVID-19: an underestimated risk. *WJPPS.* 10(9): 48-64.
- Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, *et al.* 2013. Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. *PLoS ONE.* 8(3): 59373.
- Odds FC. 2003. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother* 52 (1): 1.
- Oliveri V, Vecchio G. 2016. 8-Hydroxyquinolines in medicinal chemistry: a structural perspective. *Eur. J. Med. Chem.* 120: 252–274.
- Pai V, Ganavalli A, Kikkeri NN. 2018. Antifungal Resistance in Dermatology. *Indian J Dermatol.* 63(5): 361-368.
- Panackal AA. 2016. Combination antifungal therapy for invasive aspergillosis revisited. *Medical mycology.* 2(2).
- Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, *et al.* 2016. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 62:1–50.
- Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. 2018. Invasive candidiasis. *Nat Rev Dis Prim.* 4:1–20.
- Perlin DS. 2015. Echinocandin Resistance in *Candida*. *Clinical Infectious Diseases.* 61(6):612-17.
- Perlin DS, Rautemaa K, Richardson R, Alastruey-Izquierdo A. 2017. The global

- problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *The Lancet Infectious Diseases*. 17 (12): 383-392.
- Perfect JR. 2017. The antifungal pipeline: a reality check. *Nature reviews Drug Discovery*. 16(9): 603.
- Pfaller M. 2012. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med*. 125 (1): 3-13.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Nagy E, Dobiasova S, *et al*. 2007. *Candida krusei*, a Multidrug-Resistant Opportunistic Fungal Pathogen: Geographic and Temporal Trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *Journal Of Clinical Microbiology*. 46(2):515.
- Pharkjaksu S, *et al*. 2021. Immunopathogenesis of emerging *Candida auris* and *Candida haemulonii* strains. *Journal of Fungi*. 7(9): 725.
- Pianalto KM, Alspaugh JA. 2016. New horizons in antifungal therapy. *Journal of Fungi*. 2(4): 26.
- Pippi B, Reginatto P, Machado GDRM, Bergamo VZ, Lana DFD, Teixeira ML, *et al*. 2017. Evaluation of 8-hydroxyquinoline derivatives as hits for antifungal drug design. *Medical Mycology*, 55(7): 763-773.
- Pippi B, Machado GDRM, Bergamo VZ, Alves RJ, Andrade SF, Fuentefria AM. 2018. Clioquinol is a promising preventive morphological switching compound in the treatment of *Candida* infections linked to the use of intrauterine devices. *Journal of medical microbiology*, 67(11): 1655-1663.
- Pippi B, Lopes W, Reginatto P, Silva FÉK, Joaquim AR, Alves RJ, *et al*. 2019. New insights into the mechanism of antifungal action of 8-hydroxyquinolines. *Saudi pharmaceutical journal*, 27(1): 41-48.
- Pippi B, Merkel S, Staudt KJ, Teixeira ML, Araújo BV, Zanette RA, *et al*. 2019. Oral clioquinol is effective in the treatment of a fly model of *Candida* systemic infection. *Mycoses*, 62 (5): 475-481.
- Prasad R. 2017. *Candida albicans*: Cellular and Molecular Biology, Springer International Publishing/ Switzerland. 41.
- Pristov KE, Ghannoum MA. 2019. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*. 25(7): 792–798.
- Puértolas-Balint F, Warsi O, Linkevicius M, Tang PC, Andersson DI. 2020. Mutations that increase expression of the EmrAB-TolC efflux pump confer increased resistance to nitroxoline in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(2): 300-308.
- Quindós G. 2014. Epidemiology of candidemia in invasive candidiasis. *Revista Iberoamericana de Micología*. 31(1):42-48.
- Raja A, Park J. 2021. Disseminated *Candida lusitanae*: Nosocomial Acquisition Secondary to an Indwelling Urinary Catheter. *Case Reports in Infectious Diseases*.
- Ramage G, Saville SP, Thomas DP, Lopez-Ribot JL. 2005. *Candida* biofilms. *Eukaryot Cell*. 4, 633–638.

- Ramage G, Robertson SN, Williams C. 2014. Strength in numbers: antifungal strategies against fungal biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 43 (2):114-20.
- Ramos LS, *et al.* 2020. Susceptibility of the *Candida haemulonii* Complex to Echinocandins: Focus on Both Planktonic and Biofilm Life Styles and a Literature Review. *Journal of Fungi*. 6(4): 201.
- Reginato P, Bergamo VZ, Berlitz SJ, Guerreiro ICK, de Andrade SF, Fuentefria AM. 2020. Rational selection of antifungal drugs to propose a new formulation strategy to control *Candida* biofilm formation on venous catheters. *Brazilian Journal of Microbiology*. 51(3): 1037-1049.
- Reginato P, Joaquim AR, Rocha DA, Berlitz SJ, Kulkamp-Guerreiro IC, De Andrade SF, Fuentefria AM. 2022. 8-hydroxyquinoline and quinazoline derivatives as potential new alternatives to combat *Candida* spp. biofilm. *Letters in Applied Microbiology*. 74(3), 395-404.
- Rehman W, Arfons LM, Lazarus HM. 2011. The rise, fall and subsequent triumph of thalidomide: lessons learned in drug development. *Ther Adv Hematol* 2:291–308.
- Revie NM, Lyer KR, Robbins N, Cowen LE. 2018. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. *Current Opinion in Microbiology*. 45: 70–76.
- Ribas ADR, Spolti P, Del Ponte EM, Donato KZ, Schrekker H, Fuentefria AM. 2016. Is the emergence of fungal resistance to medical triazoles related to their use in the agroecosystems? A mini review. *Brazilian journal of microbiology*. 47(4): 793-799.
- Rocha LF, Bittencourt FM, Hernandez KM, Gonçalves SMB, Rodrigues CMG, Bergamo VZ, Calil LN, Mezzari A. 2018. Epidemiological profile of cutaneous superficial mycoses in South, Brazil. *Scientific Electronic Archives*. 11 (2): 133-137.
- Rocha LF, Pippi B, Joaquim AR, Andrade SF, Fuentefria AM. 2021. 8-hydroxyquinoline-5-(N-4-chlorophenyl) sulfonamide and fluconazole combination as a preventive strategy for *Candida* biofilm in haemodialysis devices. *Journal of Medical Microbiology*. 70(7): 1377.
- Rocha WPS; Azevedo MF; Chaves, GM. 2017. Epidemiology and fungal species distribution of superficial mycoses in Northeast Brazil. *Journal de Mycologie Médicale*. 27(1): 57-64.
- Rodrigues JAO, Duarte MCT, Rosalen PL. 2014. Coriandrum sativum L. (Coriander) Essential Oil: Antifungal Activity and Mode of Action on *Candida* spp., and Molecular Targets Affected in Human Whole-Genome Expression. *PLoS One*. 9(6):e99086
- Rodrigues ML, Nosanchuk JD. 2020. Fungal diseases as neglected pathogens: A wakeup call to public health officials. *PLoS Negl Trop Dis*. 14(2): 7964.
- Romano C, Papini M, Ghilar A, Gianni C. 2005. Onychomycosis in children: a survey of 46 cases. *Mycoses*. 48:430-437.
- Sachivkina N, Podoprigora I, Bokov D. 2021. Morphological characteristics of *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, and *Candida*

- glabrata* biofilms, and response to farnesol, *Veterinary World*, 14(6): 1608-1614.
- Sakka N, Gould IM. 2016. Role of old antimicrobial agents in the management of urinary tract infection. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 9(8): 1047-1056.
- Salari S, Seddighi NS, Almani PGN. 2018. Evaluation of biofilm formation ability in different *Candida* strains and anti-biofilm effects of Fe₃O₄-NPs compared with Fluconazole: an in vitro study. *Journal de mycologie medicale*. 28(1): 23-28.
- Sanglard D. 2016. Emerging threats in antifungal - resistant fungal pathogens. *Front. Med.* 3:11.
- Sanyaolu A, Okorie C, Marinkovic A, Abbasi AF, Prakash S, Mangat J, *et al.* 2022. *Candida auris*: An Overview of the Emerging Drug-Resistant Fungal Infection. *Infection & Chemotherapy*. 54(2):236.
- Schein CH. 2020. Repurposing approved drugs on the pathway to novel therapies. *Med Res Rev* 40:586 – 605.
- Scorzoni L, Silva ACP, Marcos CM, Assato PA, Melo WCMA, Oliveira HC, *et al.* 2017. Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis. *Frontiers in Microbiology*. 8: 36.
- Segala FV, Bavaro DF, Di Gennaro F, Salvat F, Marotta C, Saracino A, *et al.* 2021. Impact of sarscov-2 epidemic on antimicrobial resistance: a literature review. *Viruses* 13(11):2110.
- Segrelles-Calvo G, Araújo GRA, Llopis-Pastor E, Carrillo J, Hernández-Hernández M, Rey L, *et al.* 2021. *Candida* spp. co-infection in COVID-19 patients with severe pneumonia: Prevalence study and associated risk factors. *Respiratory Medicine*. 188: 106619.
- Sharma P, Bhalla M, Thami GP, Chander, J. 2019. Evaluation of Efficacy and Safety of Oral Terbinafine and Itraconazole Combination Therapy in the Management of Dermatophytosis. *Journal of Dermatological Treatment* 0(0): 1–5.
- Sharma B, Nonzom S. 2021. Superficial mycoses, a matter of concern: Global and Indian scenario-an updated analysis. *Mycoses*. 64(8), 890-908.
- Shen T, Huang S. 2016. Repositioning the old fungicide ciclopirox for new medical uses. *Curr Pharm Des*. 22(28):4443-50.
- Shim JS, Matsui Y, Bhat S, Nacev BA, Xu J, Bhang HEC, *et al.* 2010. Effect of nitroxoline on angiogenesis and growth of human bladder cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(24): 1855-1873.
- Shrestha SK, Fosso MY, Garneau-Tsodikova S. 2015. A combination approach to treating fungal infections. *Scientific reports*, 5(1):1-11.
- Sigurgeirsson B. 2016. Onychomycosis. In: Ólafsson JH., Hay Rj. (eds). *Antibiotic and antifungal therapies in dermatology*. Springer, 10: 203-289.
- Silva LN, *et al.* 2020. Unmasking the amphotericin B resistance mechanisms in *Candida haemulonii* species complex. *ACS Infectious Diseases*. 6(5): 1273-1282.

- Silva S, Rodrigues CF, Araújo D, Rodrigues ME, Henriques M. 2017. *Candida* Species Biofilms' Antifungal Resistance. *Journal of Fungi*. 3(1):8.
- Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. 2012. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*. 36(2):288-305.
- Singh A, Masih A, Khurana A, Singh PK, Gupta M, Hagen F, *et al.* 2018. High terbinafine resistance in *Trichophyton interdigitale* isolates in Delhi, India harbouring mutations in the squalene epoxidase gene. *Mycoses*. 61: 477 - 484.
- Sobke A, Klinger M, Hermann B, Sachse S, Nietzsche S, Makarewicz O, *et al.* 2012. The urinary antibiotic 5-nitro-8-hydroxyquinoline (Nitroxoline) reduces the formation and induces the dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by chelation of iron and zinc. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 56(11): 6021-6025.
- Solomon VR, Lee H. 2011. Quinoline as a privileged scaffold in cancer drug discovery. *Curr Med Chem* 18:1488–1508.
- Song JC, Stevens DA. 2016. Caspofungin: pharmacodynamics, pharmacokinetics, clinical uses and treatment outcomes. *Crit. Rev. Microbiol.*42: 813–846.
- Sosić I, Mitrović A, Ćurić H, Knez D, Žugelj HB, Štefane B, *et al.* 2018. CathepsinB inhibitors: Further exploration of the nitroxoline core. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 28(7): 1239-1247.
- Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, *et al.* 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 115(8):891-9.
- Suwanjang W, Prachayasittikul S, Prachayasittikul V. 2016. Effect of 8-hydroxyquinoline and derivatives on human neuroblastoma SH-SY5Y cells under high glucose. *Peer J*. 4: e2389.
- Sydnor ERM, Perl TM. 2011. Hospital epidemiology and infection control in acute-care settings. *Clinic Microbiol Rev*. 141—73.
- Taj-Aldeen SJ, Al-Ansari N, El Shafei S, Meis JF, Curfs-Breuker I, *et al.* 2009. Molecular identification and susceptibility of *Trichosporon* species isolated from clinical specimens in Qatar: isolation 178 A.H. Moubasher *et al.* of *Trichosporon dohaense* Taj-Aldeen, Meis & Boekhout sp. nov. *J Clin Microbiol*. 47:1791—9.
- Tamura T, Asahara M, Yamamoto M, Yamaura M, Matsumura M, Goto K, *et al.* 2014. *In vitro* susceptibility of dermatomycoses agents to six antifungal drugs and evaluation by fractional inhibitory concentration index of combined effects of amorolfine and itraconazole in dermatophytes. *Microbiol Immunol*. 58(1):1-8.
- Thomaz DY, Del Negro GMB, Ribeiro LB, da Silva M, Carvalho GOMH *et al.* 2022. A Brazilian Inter-Hospital Candidemia Outbreak Caused by

- Fluconazole-Resistant *Candida parapsilosis* in the COVID-19 Era. *J. Fungi* 8: 100.
- Tirado-Sánchez A, Bonifaz A. 2020. *Candida* Onychomycosis: an Old Problem in Modern Times. *Current Fungal Infection Reports*. 14:209–216.
- Tiseo G, Fais R, Forniti A, Melandro F, Tavanti A, Ghelardi E, et al. 2021. Fatal fungemia by biofilm-producing *Trichosporon asahii* in a liver transplant candidate. *Le Infezioni in Medicina*. 29(3): 464.
- Traba C, Liang JF. 2011. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* biofilms to reactive discharge gases. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*. 27(7):763-772.
- Tsentemidou TA, Vyzantiadis A, Kyriakou D, Sotiriadis, Patsatsi A. 2017. Prevalence of onychomycosis among patients with nail psoriasis who are not receiving immunosuppressive agents: results of a pilot study. *Mycoses*. 60: 830-835.
- Valentine-King MA, Cisneros K, James MO, Huigens RW, Brown MB. 2020. Efficacy data of halogenated phenazine and quinoline agents and an NH125 analogue to veterinary mycoplasmas. *BMC veterinary research*. 16: 1-11.
- Van Hau T, et al. 2019. Repurposing of nitroxoline drug for the prevention of neurodegeneration. *Chemical research in toxicology*, 32(11): 2182-2191.
- Wall G, Montelongo-Jáuregui D, Bonifacio BV, Lopez-Ribot JL, Uppuluri P. 2019. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*. 52: 1–6.
- Wall G, Lopez-Ribot JL. 2020. Screening Repurposing Libraries for Identification of Drugs with Novel Antifungal Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 64(9).
- Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, et al. 2008. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the infectious diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis*. 46: 327–360.
- Westerberg DP, Voyack MJ. 2014. Onychomycosis: current trends in diagnosis and treatment. *Ind J Clin Pract*. 25:309—19.
- Whaley SG, Berkow, EL, Rybak, JM, Nishimoto, AT, Barker, KS, Rogers, PD. 2017. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans Candida* Species. *Frontiers in Microbiology*. 7: 2173.
- White TC, Marr KA, Bowden RA. 1998. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev*. 11:382–402.
- Wijma RA, Huttner A, Koch BCP, Mouton JW, Muller AE. 2018. Review of the pharmacokinetic properties of nitrofurantoin and nitroxoline. *J Antimicrob Chemother*. 73 (11): 2916–2926.
- Wiseman H, Cannon M, Arnstein HR. 1989. Observation and significance of growth inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* (A224A) by the anti-oestrogen drug tamoxifen. *Biochem. Soc. Trans*. 17:1038–1039.
- Wykowski, R, Fuentesfria, AM, De Andrade, SF. 2022. Antimicrobial activity of clioquinol and nitroxoline: a scoping review. *Archives of Microbiology*. 204(8): 1-31.

- Xu N, Lin W, Sun J, Sadahira T, Xu A, Watanabe M, *et al.* 2020. Nitroxoline inhibits bladder cancer progression by reversing EMT process and enhancing anti-tumor immunity. *Journal of Cancer*. 11(22): 6633.
- You Z, Ran X, Dai Y, Ran Y. 2018. Clioquinol, an alternative antimicrobial agent against common pathogenic microbe. *Journal de mycologie medicale*, 28(3): 492-501.
- You Z, Zhang C, Ran Y. 2020. The effects of clioquinol in morphogenesis, cell membrane and ion homeostasis in *Candida albicans*. *BMC Microbiol* 20(1):165.
- Zhai B, Wu C, Wang L, Sachs MS, Lin X. 2012. The antidepressant sertraline provides a promising therapeutic option for neurotropic cryptococcal infections. *Antimicrob Agents Chemother* 56:3758 –3766.
- Zhang YH, Raymick J, Sarkar S, Lahiri DK, Ray B, Holtzman D, *et al.* 2013. Efficacy and toxicity of clioquinol treatment and A-beta42 inoculation in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res*. 10: 494–506.
- Zhou P, Liu Z, Chen Y, Xiao Y, Huang X, Fan X. 2020. Bacterial and fungal infections in COVID-19 patients: A matter of concern. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 41(9), 1124-1125.
- Ziccardi M, Souza LO, Gandra RM, Galdino ACM, Baptista AR, Nunes APF, *et al.* 2015. *Candida parapsilosis* (sensu lato) isolated from hospitals located in the Southeast of Brazil: Species distribution, antifungal susceptibility and virulence attributes. *International Journal of Medical Microbiology*. 305: 848-859.
- Zuo R, Garrison AT, Basak A, Zhang P, Huigens RW, Ding Y. 2016. In vitro antifungal and antibiofilm activities of halogenated quinoline analogues against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 48 (1): 208–211.